ميكروبيولوجيا الأغذية

Food Microbiology

د. فهد عبدالحميد الشرجبي

أستاذ علوم الأغذية المشارك – جامعة تعز

الطبعة الأولى - 2015م

بسم الله الرحمن الرحيم

تقديم:

الحمد لله القائل في محكم كتابه الحكيم ﴿يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُواْ كُلُواْ مِن طَيِّبَاتِ مَا رَزَقْنَاكُمْ وَاشْكُرُواْ لِلّهِ إِن كُنتُمْ إِيَّاهُ تَعْبُدُونَ﴾ صدق الله العظيم [البقرة: 172]، أحمده وأستعين به وأثني عليه الخير كله كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه، وأصلي وأسلم على حبيبه ورسوله سيدنا محمد ﷺ معلمنا وهادينا إلى الصراط المستقيم القائل (من سلك طريقا يلتمس فيه علما سهل الله له به طريقا إلى الجنة) صدق رسول الله ﷺ.

ثم أما بعد، تزخر المكتبة العربية والعالمية بالعديد من كتب ميكروبيولوجيا الأغذية لكني عانيت خلال تدريسي لمقررات ميكروبيولوجيا الأغذية وميكروبيولوجيا الألبان وتصنيف البكتيريا وغيرها من المقررات أن هذه الكتب (وغيرها من الكتب المنهجية أو المرجعية) لا تكون متاحة للطالب اليمني في مرحلة دراسته الجامعية وذلك بسبب عدم توفرها بالأعداد الكافية في مكتبات كلياتهم التي يدرسون بها، حيث أن أعدادها المتوفرة لا تسمح لجميع الطلبة الدارسين باستعارتها، وحتى من يتمكن من استعارتها ففترة الاستعارة قصيرة جداً لا تمكنه من الاستفادة القصوى منها.

كما أن شريحة واسعة جداً من الطلبة لا يستطيعون اقتناء تلك الكتب المنهجية أو المرجعية بسبب كلفتها المادية التي تشكل عبئ ثقيل عليهم ولهذا فقد أردت في هذا العمل أن أقدم بإذن الله تعالى للطالب الجامعي كتاب منهجي سائلاً المولى عز وجل أن يجعله من العلم الذي يُنتفع به.

وختاماً أحمد الله الذي وفقني لإنجاز هذا الكتاب، وما كان من توفيق في هذا العمل فمن الله عز وجل، وما كان من قصور أو تقصير أو أخطاء فمن نفسي.

والله من وراء القصد.

د. فهد عبدالحميد الشرجبي

تعز في 24 ربيع الثاني 1436هـ
الموافق 13 فبراير 2015م

المــــحتـويـــــــات

الـمــــــــــــوضوع	رقم الصفحة

الجزء الأول: الأحياء المجهرية في الأغذية

الفصل الأول: مدخل إلى ميكروبيولوجيا الأغذية	1
الفصل الثاني: الأحياء المجهرية ذات الأهمية في الأغذية	14
الفيروسات ذات الأهمية في الأغذية	22
البكتيريا ذات الأهمية في الأغذية	40
الفطريات ذات الأهمية في الأغذية	159
الطحالب وعلاقتها بميكروبيولوجيا الأغذية	209
الطفيليات المعوية المنتقلة عن طريق الأغذية	213

الجزء الثاني: ميكروبيولوجيا الأغذية

الفصل الثالث: الغذاء: تركيبه، مصادر تلوثه، عوامل تلفه ووسائل حفظه	221
الفصل الرابع: الفحوصات الميكروبيولوجية للأغذية	243
الفصل الخامس: ميكروبيولوجيا اللحوم والدواجن	312
الفصل السادس: ميكروبيولوجيا الأسماك والقشريات	336
الفصل السابع: ميكروبيولوجيا البيض ومنتجاته	343
الفصل الثامن: ميكروبيولوجيا الخضروات والفواكه	353
الفصل التاسع: ميكروبيولوجيا الأغذية المعلبة	369
الفصل العاشر: ميكروبيولوجيا الحبوب والسكر وبعض الأغذية الأخرى	409
الفصل الحادي عشر: ميكروبيولوجيا مياه الشرب، المياه المعبأة والمياه الغازية	430

الجزء الثالث: ميكروبيولوجيا الألبان

الفصل الثاني عشر: ميكروبيولوجيا الحليب	443
الفصل الثالث عشر: إنتاج الحليب النظيف	473
الفصل الرابع عشر: ميكروبيولوجيا منتجات الحليب	504
الفصل الخامس عشر: ميكروبيولوجيا الألبان المتخمرة	525
الفصل السادس عشر: ميكروبيولوجيا الجبن	582
الفصل السابع عشر: الشئون الصحية في مصانع ومعامل الأغذية والألبان	599
المراجع	616

حقوق الطبع محفوظة للمؤلف، ولا يجوز طباعة هذا الكتاب لأغراض تجارية أو ربحية.
وأي جهة ترغب في طباعة هذا الكتاب وتوزيعه مجاناً أو بسعر رمزي لا يتجاوز كلفة طباعته فبإمكانها الحصول على إذن خطي من المؤلف بذلك.

الجزء الأول

الأحياء المجهرية في الأغذية

Microorganisms in Food

الفصل الأول

مدخل إلى ميكروبيولوجيا الأغذية

Introduction to Food Microbiology

إن ميكروبيولوجيا الأغذية **Food Microbiology** هو أحد مجالات علم الأحياء المجهرية **Microbiology** والذي يدرس تلك الأحياء المجهرية والتي لا ترى بالعين المجردة بل باستخدام المجهر **Microscope** سواء الضوئي أو الإلكتروني، فهو يبحث علاقة تلك الأحياء المجهرية بالغذاء، سواء تلك الأحياء المجهرية التي تتسبب بحدوث حالات التسمم الغذائي أو تلك الأحياء المجهرية الممرضة المنتقلة عن طريق الغذاء، أو من حيث ارتباط هذه الأحياء بالتغيرات التي تحدث للأغذية المختلفة، سواء كانت هذه التغيرات مفيدة كتلك التي تحدث أثناء تصنيع منتجات الأغذية المتخمرة، أو تغيرات ضارة كتلك التي تحصل أثناء عمليات فساد الغذاء، كما أمكن من خلال دراسة هذا العلم لمظاهر الفساد في الأغذية استخدام وسائل معينة لحفظ الأغذية والسيطرة على نمو الأحياء المجهرية فيه بوسائل مختلفة مثل الحرارة سواءً العالية (البسترة والتعقيم) أو المنخفضة (التبريد والتجميد) أو التجفيف أو التخمر أو إضافة بعض المواد الكيميائية مما يسهم في حفظ الأغذية المختلفة وتوفرها لأوقات أو مواسم يقل فيها إنتاج هذه الأغذية.

تاريخ علم ميكروبيولوجيا الأغذية:-

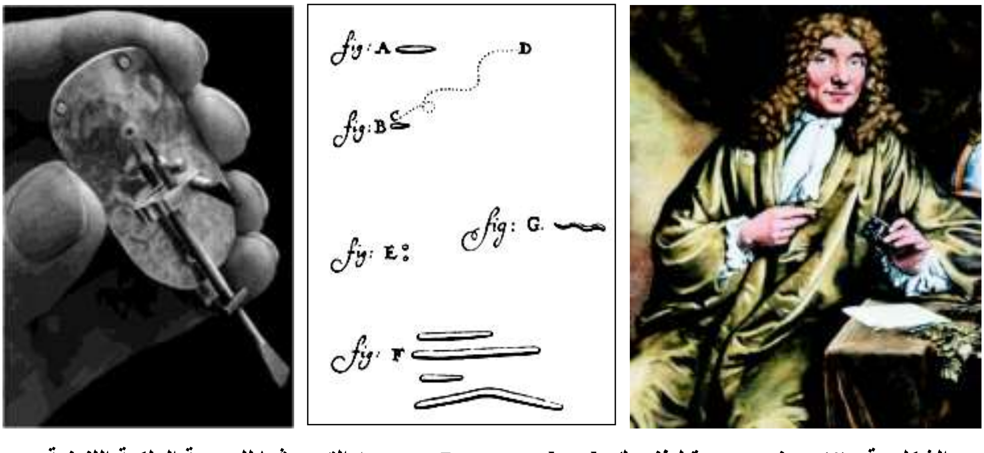
منذ زمن طويل وقبل أن يعرف الإنسان أو يكتشف تلك الأحياء المجهرية، لاحظ العديد من الظواهر وتعرف إلى العديد من العمليات هي في الأساس عمليات حيوية (أي أن حدوثها مرتبط بوجود هذه الأحياء) ومن أهم هذه الظواهر والعمليات يمكننا أن نذكر تخمر الخبز و تخمر الألبان، والتغيرات التي تحصل أثناء إنضاج الجبن أو إنتاج الأغذية المتخمرة وكذلك فساد الأغذية وغيرها، لكنه لم يعرف أن وراء هذه العمليات والتحولات كائنات حية لا يستطيع رؤيتها بعينه المجردة، كذلك عزى حدوث الأمراض وانتشار الأوبئة إلى أسباب كثيرة، لكنه لم يعرف أن كثيراً من هذه الأمراض والأوبئة تحدث بسبب بعض الأحياء المجهرية الممرضة.

إلا أن من أوائل الإشارات التي ربطت بين العوامل المسببة للأمراض وتلك المسببة لفساد الغذاء كانت من قبل العالم العربي المسلم أبوبكر الرازي في القرن التاسع الميلادي الذي أعتقد أن حدوث الأمراض المعدية له مسببات غير مرئية وهي أيضاً تتسبب في فساد الغذاء، وهذا واضح بجلاء في القصة المعروفة عن اختياره لموقع البيمارستان (المستشفى) الذي كلفه عضد الدولة البويهي باختيار موقع له في مدينة بغداد، حث أمر الرازي بتعليق قطع اللّحم في أماكن مختلفة من

بغداد ثم اختار المحل الذي بقى فيه اللّحم محافظاً على جودته لمدة أطول. ولكن ورغم كل ذلك لم يستطيع علماء العرب والمسلمين آنذاك تجاوز هذه الفرضيات النظرية وتطويرها وتحويلها إلى نظريات مدعمة بالقرائن نتيجة لعوامل عدة، أهمها: انعدام التقنيات اللازمة لذلك، ودخولهم في عصر جديد قديم هو عصر الانحطاط والذي لا يزال قائماً حتى اليوم.

ولعل أول الإشارات الفعلية حول تلك الأحياء المجهرية هي ما قدمه كيركر **Kircher** في عام 1659م الذي أشار إلى "ديدان دقيقة" لا ترى موجودة في الحليب واللّحوم المحفوظة والأجسام المتعفنة والإفرازات المصاحبة لحالات الإسهال.

لكن أول من شاهد الأحياء المجهرية ووصفها كان ذلك التاجر الهولندي انطوني فان ليفنهوك **Antony van Leeuwenhoek** والذي يعمل في تجارة الأقمشة، لكنه كان يهوى صناعة العدسات المكبرة وكان شغوفاً بالنظر من خلالها إلى الأشياء المحيطة به فكان يعجب من تلك التفاصيل الدقيقة التي تمكنه مجاهره وعدساته المكبرة من رؤيتها في حين كان لا يستطيع رؤية تلك التفاصيل العجيبة بعينه المجردة. وقد ولد ليفنهوك **Leeuwenhoek**، في مدينة ديلفت في هولندا عام 1632م وتوفي في عام 1723م، وكان قد شاهد البكتيريا لأول مرة عام 1676م في قطرة من الماء فحصها تحت أحد المجاهر التي كان يصنعها، فشاهد أحياء دقيقه ذات أشكال وأحجام مختلفة وسماها الحيوانات الصغيرة **Little Animalcules**، وأرسل رسالة بما اكتشفه إلى الجمعية الملكية اللندنية وقد بعث مع هذه الرسالة رسوم لهذه الحيوانات، وكانت هذه الرسوم توضح بشكل جيد أشكال مختلفة للبكتيريا الكروية والعصوية والعصوية القصيرة والحلزونية وغيرها، والشكل التالي يوضح صورة ليفنهوك وتلك الرسوم التي بعثها للجمعية الملكية اللندنية ومجهره الذي استخدمه في اكتشاف الأحياء المجهرية.



الشكل رقم (1) يوضح صورة ليفنهوك **Leeuwenhoek** ورسومه التي بعثها للجمعية الملكية اللندنية، والمجهر الذي استخدمه في اكتشاف الأحياء المجهرية، عن (Prescott, *et al.* 2002).

وقد أثارت اكتشافات ليفنهوك اهتمام كثير من العلماء، وكانت بمثابة الدفعة القوية نحو دراسة عالم الأحياء المجهرية، ومع هذا وذاك فقد ظل العلماء لفترة طويلة غير قادرين الربط بين هذه الاكتشافات و تفسير أسباب التخمر، والتعفن، وحدوث الأمراض المعدية، ومضت أكثر من 150 عاماً قبل أن يتم بنجاح الوصول إلى ذلك الربط، حيث أنه ومنذ أن اكتشف ليفنهوك الكائنات الدقيقة الموجودة في الماء السوائل، بدأ العلماء يتساءلون عن أصل ومصدر هذه الكائنات انقسموا منذ البداية إلى اتجاهين، الاتجاه الأول: يعتقد هذا الاتجاه أن الكائنات الدقيقة تتكون تلقائيا من مواد غير حية موجودة في الماء والسوائل، وقد أطلق على هذا الاعتقاد القائل بالتكون التلقائي للكائنات الحية بداء من مواد غير حية اسم فرضية التوالد الذاتي Spontaneous Generation، وهذه الفرضية قديمة المنشئ، ويعتقد دعاتها بان عددا من الحيوانات والنباتات الراقية يمكن أن تتوالد ذاتيا ضمن شروط خاصة. وكان الفيلسوف اليوناني ارسطوطاليس (384 - 322 ق. م) من دعاة هذه الفرضية. وقد ظل هذا الاعتقاد سائدا حتى القرن السابع عشر.

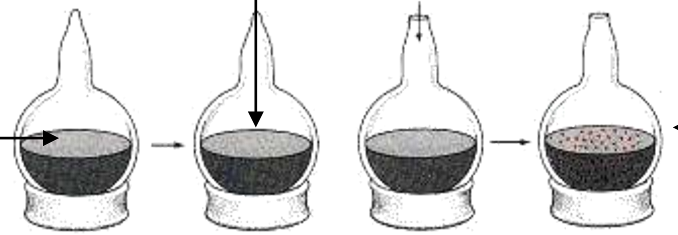
أما الاتجاه الثاني: فيعتقد العلماء أن أصول الأحياء المجهرية تتواجد دائما في الهواء، وعندما تصل إلى السوائل العضوية تنمو وتتكاثر، خاصة إذا توفرت لها الظروف الملائمة. وكان هذا الاعتقاد يعبر عن ما عرف فيما بعد بميكروفلورا الهواء الجوي والايروسبورا. وقد بدأ عدد من العلماء الذين تبنوا هذا الاتجاه القيام بالتجارب العلمية التي حاولوا من خلالها إثبات خطأ الاعتقاد بفرضية التوالد الذاتي Spontaneous Generation.

إن أول التجارب على الإطلاق التي أثبتت خطأ بفرضية التوالد الذاتي هي ما قام بها فرانسيسكو ريدي Francesco Redi الذي لم يقتنع بالرأي المُسلم به قديما والذي يقول أن الديدان التي تنمو في اللحم تنشئ من اللحم نفسه إذا ترك معرضا للهواء في مكان دافئ، فقام في عام 1665م بإجراء تجربة أثبتت عدم صحة الاعتقاد القائل بالتوالد الذاتي ليرقات الذباب من اللحم، حيث قام بوضع اللحم في وعاء محكم مغطى بقطعة من القماش الناعم بحيث يضع الذباب بيضه على قطعة القماش التي ينجذب إليها بفعل رائحة اللحم، دون أن يتمكن من الوصول إلى قطعة اللحم المغطاة.

الشكل رقم (2) تجربة فرانسيسكو ريدي Francesco Redi لدحض نظرية التوالد الذاتي.

وبعد اكتشاف ليفنهوك للأحياء المجهرية، اعتبر أنصار فرضية التوالد الذاتي أن هذا الاكتشاف يعد دليلا قويا على صحة فرضية التوالد الذاتي، وعملوا على استخدامه في إثبات صحة هذه النظرية، فقد قام جون نيدهايم **John Needham** في عام **1749**م بإجراء تجربة أثبت فيها أن اللّحم المغلي في وعاء مغلق تظهر فيه الأحياء المجهرية بعد فترة من المعاملة الحرارية التي يفترض أن تقضي عليها، وبالتالي فظهورها يعني نشوْ هذه الأحياء تم من اللحم نفسه، وصرح بان الكائنات الحية تظهر في المستخلصات دائما مهما كانت نوع المعاملة التي تعامل بِها هذه المستخلصات، وسواء كانت هذه المستخلصات مفتوحة أم مغلقة تم غليها أم لم يتم ذلك.

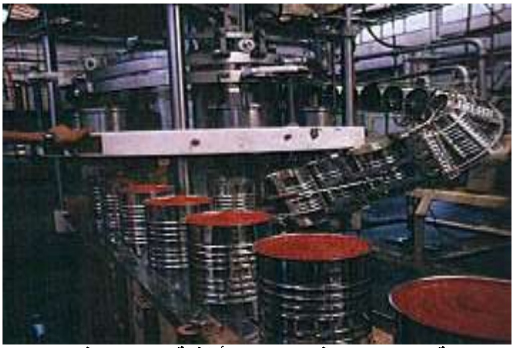
لكن لازارو سبالانزاني **Lazzaro Spallanzani** عام **1765**م قام بغلي مرق اللّحم في دورق زجاجي لمدة ساعة وقام بعدها بسد فوهتها بواسطة غلقها بالحرارة، فلم يشاهد أي كائنات حية. وقد اثبت بهذه التجربة بان المستخلصات المغلية في أوعية مغلقة، ولمدة كافية يمنع ظهور الأحياء الدقيقة فيها ما دامت مغلقة. ولكن الحياة تتجدد فيها وتبدأ الأحياء الدقيقة بالظهور فيها بعد تعريضها للهواء، وهذا ما يوضحه الشكل التالي.



الشكل رقم (3) تجربة سبالانزاني **Spallanzani** لدحض فرضية التوالد الذاتي.

وقد استفاد صانع الحلويات الفرنسي نيكولاس أبرت **Nicolas Appert** من تجربة سبالانزاني **Spallanzani** في ابتكاره لعملية تعليب الأغذية، في استجابته للنداء الذي أطلقه نابليون بمنح شهرة ومال قدره **12000** فرنك فرنسي لمن يستطيع حفظ الغذاء لجنوده أثناء المعارك التي كانت دائرة في أوربا، فتمكن أبرت **Appert** في عام **1795**م من النجاح في حفظ الأغذية لفترات طويلة في عبوات زجاجية مغلقة معاملة بالحرارة حتى درجة الغليان، وقد تمكن من نيل تلك الجائزة في عام **1804**م، ودون طريقته تلك في كتاب أسماه **The Art of Appertizing**، وسرعان ما استخدمت هذه العملية وطورت في صناعات الأغذية، فبعد ذلك حصل الانجليزي **Peter Durand** في عام **1810**م على براءة اختراع لصناعة علب معدنية مطلية بالقصدير تستخدم في عمليات تعليب الأغذية، (وقد أدى ذلك لاحقاً في عام **1900**م إلى

ظهور العلبة الصحية **Sanitary Can** المستخدمة حتى وقتنا الحاضر، والتي بدأ استعمال الطلاء الداخلي فيها عام 1921م)، كما تمكن شيفاليير أبرت **Chevallier-Appert** في عام 1851م من اختراع المعقم الموصد الذي تم استخدامه في تعقيم الأغذية المعلبة، بعدها تمكن شرايفر **Shriver** في عام 1874م من اختراع معقم بخاري مزود بوسائل أمان يتحمل الضغط العالي.



الشكل رقم (4) الاستفادة من تجربة سبالانزاني في تعليب الأغذية (تعبئتها في علب وغلقها وتعقيمها بالحرارة).

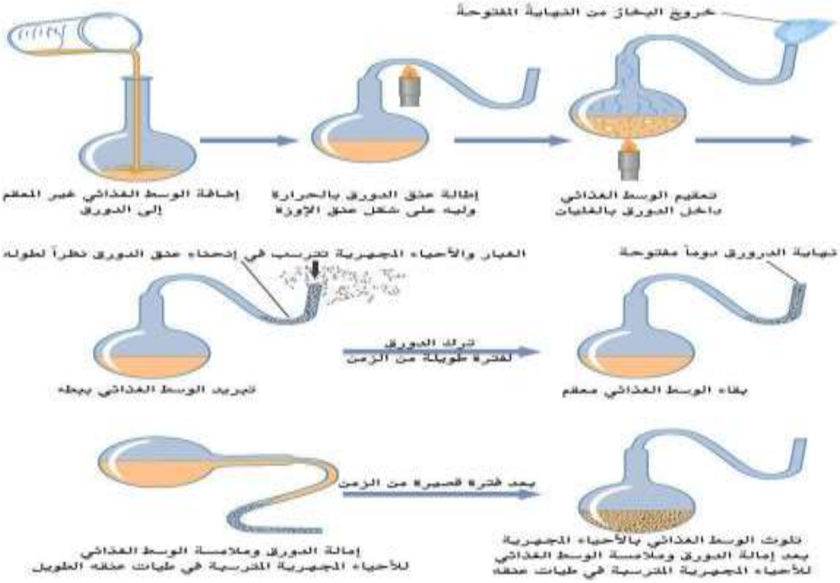
وعودة إلى تجربة سبالانزاني، أصر نيدهايم الذي كان معاصراً له، على أن وجود الهواء أمر ضروري لنشوء الكائنات الحية من المرق، وان غيابها عائد إلى عدم وجود الهواء نتيجة لإغلاق الدورق. وقد استمرت المحاولات لحُسم هذا الأمر، وكانت المحاولة الأبرز بعد ثلاثة وسبعين عاما عندما قام فرانز شولتز **Franz Schulze** وثيودور شوان **T. Schwann**، كل على حِدة عام 1838م بدراسة دور الهواء في نشوء الأحياء الدقيقة، فقام شولتز بتمرير الهواء أولا في محلول الأحماض والقواعد القوية، في حين مرر ثيودور شوان الهواء في أنابيب حلزونية مسخنة لدرجة الاحمرار قبل أن يصل إلى المرق، فلم يشاهدا أي ظهور للكائنات الحية في هذا المرق. وبذلك دحضا ما أشار إليه نيدهايم عن دور الهواء وبأنه ضروري لنشوء الكائنات الدقيقة في المرق، وقد أكدا من خلال التجربة بان الهواء ليس له أي دور في نشوء الأحياء الدقيقة في المرق المعرض للهواء الساخن أو الهواء الذي مر من خلال حامض قوي. ومع ذلك لم يقتنع أصحاب فرضية التوالد الذاتي بذلك، مدعين بان تمرير الهواء في الحمض القوي أو الأنابيب المسخنة لدرجة الاحمرار يفسد هذا الهواء لدرجة تجعله غير صالح لنشوء الكائنات الحية الدقيقة.

وفي عام 1850م قام كل من فون دُتش **Von Dutch** وشرودر **Schroeder**، مشتركين بإجراء تجربة قاما من خلالها بتمرير الهواء خلال أنبوبة محتوية على كمية من القطن قبل تمريره في المرق المغلي، وقد عمل القطن على حجز الأحياء الدقيقة من الهواء المار. وهنا يخرج الهواء من خلال القطن خاليا من الأحياء المجهرية، وقد أدت هذه التجربة إلى استعمال السدادات القطنية في المختبرات والتجارب الميكروبيولوجية في سد الأنابيب والأوعية التي تحتوي على مزارع بكتيرية.

ومع كل ذلك بقيت فرضية التوالد الذاتي قائمة إلى أن قام العالم الفرنسي الشهير لويس باستير **Louis Pasteur** في عام **1864**م بتصميم تجربة قدمت دليلاً قاطعاً على عدم صحة فرضية التوالد الذاتي، وبذلك قضى على هذه النظرية بشكل نهائي.

الشكل رقم (5) عملة فرنسية من فئة 5 فرنكات تكريم للعالم لويس باستير **Louis Pasteur** (يمين)، معهد باستير في باريس- فرنسا (يسار)، عن (**Madigan, *et al*. 2012**).

قام لويس باستير بتجهيز دورقاً ذا رقبة طويلة ملتوية (على شكل عنق الإوزة) وضيقة الفتحة يحتوي على مرق مغلي ولم يقم بمعاملة الهواء أو ترشيحه بأي طريقة من الطرق المعروفة حيث يمكن للهواء المرور من خلال الأنبوبة، ولكن محتوياته من الأحياء المجهرية تترسب خلال مرورها نظراً لطول وضيق عنق الدورق (الذي أشار له بفكرته صديقه بالارد **Balard** الذي كان في بدء حياته صيدلانياً)، وبهذه الطريقة لم يظهر بالمرق أي من الأحياء المجهرية، وقام باستير بنشر نتائج عمله هذا في جامعة السوربون عام **1864**م، وتظهر تفاصيل هذه التجربة المهمة بالشكل التالي:



الشكل رقم (6) تجربة باستير التي دحض من خلالها فرضية التوالد الذاتي **Spontaneous Generation**، عن (**Madigan, *et al*. 2012**).

إن هذا العمل الهام يعتبر إنجازاً كبيراً في مجال علم الأحياء المجهرية تحقق على يد العالم الكبير لويس باستير **Louis Pasteur**، لكنه ليس الإنجاز الوحيد فقد كشف باستير أسرار التخمر الذي يحصل بواسطة الأحياء المجهرية، كما أشار إلى استخدام المعاملة الحرارية للقضاء على الأحياء المجهرية المتسببة في فساد النبيذ الذي تشتهر فرنسا بصناعته، وقد نُسب هذا النوع من المعاملات الحرارية إليه وسمي باسمه **Pasteurization**، وقد استخدمت هذه المعاملة الحرارية المعروفة بالبسترة **Pasteurization** بعد ذلك في حفظ الحليب في ألمانيا عام 1880م.

ويمكننا القول أن لويس باستير **Louis Pasteur** قد وضع حجر الأساس لعلم الميكروبيولوجيا الحديثة. وقد كان من حيث التخصص كيميائياً وعمل في مجال الكريستالوجرافيا (علم البللورات)، لكنه بدأ نشاطه الميكروبيولوجي وأبحاثه التي وضعت الأسس للميكروبيولوجيا كعلم جديد ومستقل من خلال دراسته للتخمرات، عندما طلب منه أحد رجال الصناعة الفرنسية في مدينة ليل مساعدته في معرفة أسباب الفشل الذي يتكرر لأكثر من مرة في عملية تخمر العصير السكري للحصول منه على الكحول.

وفي عام 1857م ألقى باستير محضرة في جمعية ليل للعلوم والزراعة والفن حول التخمر الحمضي اللاكتيكي، ثم أصدر بعد ذلك مذكرة حول التخمر الحمضي اللاكتيكي، وفي عام 1858م بدأت تصدر نتائج لأبحاثه المختلفة في مجال التخمر.

وقبل ذلك التاريخ كان هنالك جدل كبير حول طبيعة التخمر حيث عرف الإنسان عمليات التخمر منذ القدم واستخدمها في حياته اليومية ولكنه لم يستطع أن يكتشف الأسباب التي تؤدي إلى هذه العلمية. وفي القرون الوسطى اعتبرت هذه العلميات من قبل العاملين في مجال الكيمياء عمليات كيميائية، ومن أهم من أشار إلى ذلك كان الكيميائي الهولندي فان هلمونت **Helmont** الذي عاش في الفترة من 1577- 1644م، وقد أستخدم هذا المصطلح لتحديد العمليات الكيميائية التي تتم مع انطلاق غاز ثاني أُكسيد الكربون (CO_2). وسادت هذه النظرية لفترة من الزمن بالرغم من أن هناك علماء حاولوا الخروج بعملية التخمر من إطار النظرية الكيميائية من خلال ربطها ببعض الكائنات الدقيقة والذين كان من أولهم الفرنسي بيتون **Button** الذي استطاع أن يعطي الإيضاحات الأولية للارتباطات القائمة بين الخمائر وظاهرة التخمر والتعفن التي وصفها ليفنهوك، كذلك الفرنسي ديماريي **Demarier** الذي وصف بنية أحياء دقيقة هي (الخمائر) ***Mycoderma cerevisia***، التي تكون طبقة رقيقة على سطح البيرة، مع أنه لم يستطع أن يوضح أو يورد أي علاقة تربط بين تكون هذه الطبقة وعملية التخمر، وكان من أهم الأعمال في هذا السياق ما قام به الفرنسي كانيار دي لاتور **Caginar de Latour** في عام 1836م الذي

قام بدراسة ميكروسكوبية دقيقة للراسب المتكون في حالة التخمر الكحولي، وتمكن من الوصول إلى نتيجة مفادها أن هذا الراسب يتكون من كائنات حية دقيقة، ويعتبر التخمر في ذات الوقت نتيجة من نتائج نشاطها الحيوي، إضافة إلى ما قام به كلٍ من الألمانيين كوتزنج **kűthzing** وثيودور شوان **Theodor Schwann** بشكل منفرداً عام 1837م أثناء دراستهما لعملية تحول الكحول إلى خل، حيث أثار انتباههما وجود الكتلة الهلامية التي تتكون على هيئة طبقة على سطح السائل الذي يحتوي على الكحول، وأثبت من خلال دراسته أن هذه الكتلة تتكون من أحياء مجهرية ذات علاقة مباشرة بعملية تراكم الخل في الوسط. وقد أكد باستير بما لا يدع مجالاً للشك بأن عملية التخمر الكحولي مرتبطة بالنشاط الحياتي لأحياء دقيقة محددة هي الخمائر وتتم في ظروف لا هوائية، وبهذا قام باستير بالتأكيد على النتائج التي وصل إليها كل من كانيار دي لاتور وكوتزنج وشوان والتي تقول بأن التخمر عملية بيولوجية وتسببها كائنات حية دقيقة.

كما كان للويس باستير **Louis Pasteur** إسهامه في مجال دراسة الأحياء المجهرية المرضية فقد اكتشف إن المرض الذي أصاب دودة الحرير في عام 1865م وأدى إلى تكبد منتجي الحرير في فرنسا خسائر كبيرة كان سببه أحد الأحياء المجهرية، كما أكتشف مسببات مرض كوليرا الدجاج، والسعار واستطاع التوصل إلى وسائل لوقاية الجسم من الإصابة بِها مرة أخرى، وقد صارت هذه العلمية من الأسس المهمة التي قامت عليها نظرية التحصين والمناعة فيما بعد، ومن الممكن القول أن باستير بأعماله الكلاسيكية في دراسة الأمراض المعدية وسبل مقاومتها وضع البدايات الصحيحة الأولى لتطور الميكروبيولوجيا الطبية، لكن وعلى الرغم من إسهامات لويس باستير **Louis Pasteur** في مجال علم الميكروبيولوجيا عموماً ووضعه للبدايات الصحيحة الأولى لتطور الميكروبيولوجيا الطبية، إلا أن انجازات روبرت كوخ **Robert Koch**، في مجال علم الميكروبيولوجيا الطبية جعلته يشار إليه كمؤسس لهذا العلم.

الشكل رقم (7) صورة للعالم الألماني روبرت كوخ **Robert Koch**، عن (**Madigan, *et al.* 2012**).

وكان لروبرت كوخ **Robert Koch** دور كبير في تطور علم الميكروبيولوجيا الطبية. فقد بدأ في عام 1872م دراسة الأمراض المعدية بالبحث عن مسببات الأمراض المعدية وخاصة الجمرة الخبيثة التي مات بسببها آنذاك من المناطق الشرقية من المانيا أعداد هائلة من الماشية حيث استطاع روبرت كوخ أن يعزل خلايا البكتيريا التي تسبب الجمرة الخبيثة التي سماها ***Bacillus anthracis*** من دم حيوانات ماتت بسبب هذا المرض وأن يزرعها في مزرعة نقية، حيث قام بدلك ما حصل عليه من دم الحيوانات الميتة بفعل هذا المرض على أسطح قطع مستوية من البطاطس المغلية، وبعد مضي فترة من الزمن لاحظ ظهور بقع لامعة عليها وهذه البقع هي عبارة عن تجمع لخلايا بكتيرية (مستعمرات)، وقد استطاع أن يعزل مزارع نقية من خلال زراعة كل مستعمرة منفصلة على بيئة غذائية لحالها وبهذا استطاع أن يعزل الأنواع البكتيرية المختلفة عن بعضها، كما كان روبرت كوخ أول من أستخدم تصوير البكتيريا. وقد تمكن روبرت كوخ من تحضير المزارع النقية باستخدام الجيلاتين **Gelatin** لاحقاً عام 1881م وقد أكتسب ذلك أهمية كبيرة في عملية التطور اللاحق لعلم الميكروبيولوجيا، كما تمكنت السيدة فاني هيس **Fannie Hesse** وهي زوجة أحد تلاميذ روبرت كوخ ويدعى ولتر هيس **Walter Hesse** في عام 1882م من استخدام الآجار **Agar** بدلا من الجيلاتين القابل للسيولة في المزارع البكتيرية والذي يتحلل بفعل الإنزيمات الميكروبية المحللة للبروتين وقد انتشر استخدامه على نحو مطلق في معامل الميكروبيولوجي لما يتميز به من مميزات متعددة.

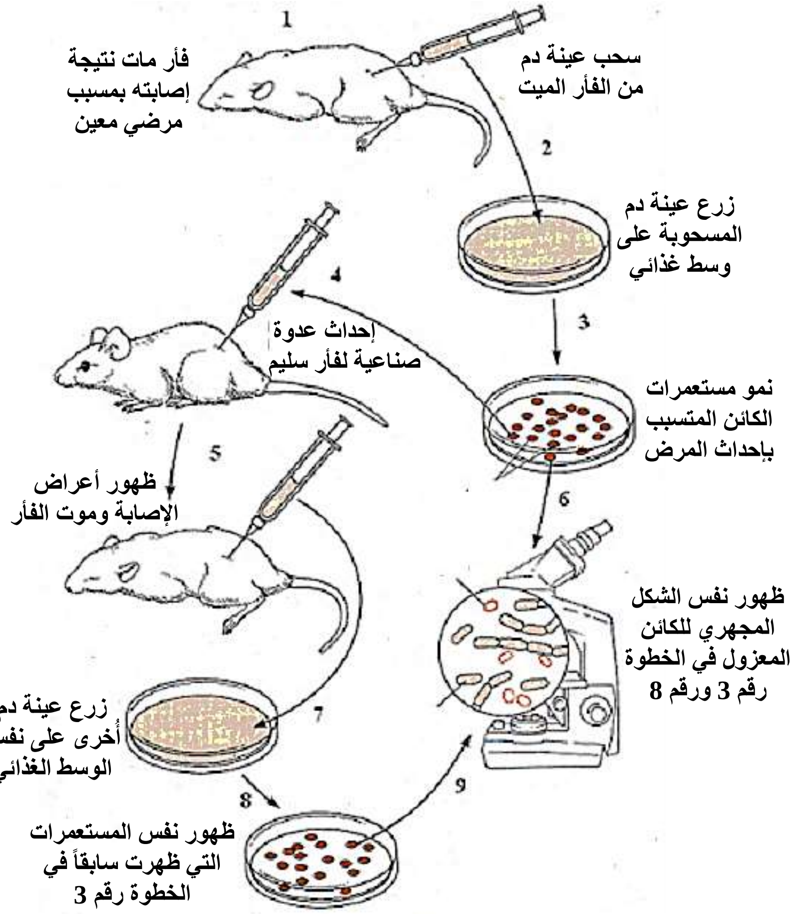
كما أكتشف روبرت كوخ في عام 1882م الكائن المسبب لمرض السل وسماه ***Mycobacterium tuberculosis*** وعزل هذه البكتيريا في مرزعة نقية، وقد أثبت كوخ من خلال حقن بعض الحيوانات بهذا الميكروب وظهرت لديهم أعراض المرض، كما تمكن من اكتشاف الميكروب الذي سبب الكوليرا ***Vibrio cholerae*** وكان ذلك في الهند عام 1883م. ومن خلال ذلك وضع كوخ **Koch** فرضياته المشهورة لتشخيص الأمراض التي تسببها الكائنات المجهرية، ويمكن إيراد فرضيات كوخ الموضحة في الشكل رقم (8) على النحو التالي:

1- وجود الميكروبات في جميع حالات المرض في أنسجة وأعضاء المريض.

2- يجب عزل الميكروب من أنسجة وأعضاء العائل وتنقيته في مزرعة نقية والحصول على أعراض مرضية مشابهة لأعراض المرض الأصلي منه.

3- يجب أن يظهر المرض عند تلقيح أو حقن حيوان سليم بالميكروب المعزول.

4- عزل الميكروب من جديد من العائل الذي حقن وأصيب بالمرض اصطناعيا وذلك بصورة نقية.



الشكل رقم (8) فرضيات كوخ Koch لتشخيص الأمراض التي تسببها الأحياء المجهرية.

وإضافة إلى أولئك العلماء السابق ذكرهم كان هنالك آخرين أسهموا إسهام كبير في مجال علم الميكروبيولوجي ومن أمثلهم الجراح الإنجليزي جوزيف لستر Joseph Lister (1827 – 1912م) الموضحة صورته في الشكل رقم (9) والذي استخدم الفينول كمادة معقمة في العمليات الجراحية ولتعقيم أدوات الجراحة، فشكل ذلك نقلة كبيرة في نجاح العمليات الجراحية، كما كان أول من استخدم سلسلة التخافيف في الحصول على أحياء مجهرية معزولة بصورة نقية.

كذلك عالم المناعة الروسي إيلي متشنكوف Élie Metchnikoff (1845 – 1916م) الموضحة صورته في الشكل رقم (10) حيث كان له إسهامات كبيرة في مجال علم المناعة، وكان أول من أشار إلى الاستخدامات العلاجية للألبان المتخمرة.

وقد كان لإشارة متشنكوف Metchnikoff حول الاستخدامات العلاجية للألبان المتخمرة كبير الأثر في زيادة الاهتمام بهذا النوع من المنتجات اللبنية، مما حدا بعدد من الباحثين بدراسة الأحياء المجهرية المتواجدة فيها فقد قام الاسترالي أدامتز Adametz عام 1889م باستخدام مزارع بادئ نقية Starter Culture في صناعة الجبن، كما قام كون Cohn باستخدام بادئات نقية من البكتيريا في صناعة الزبد، وفي نهاية القرن التاسع عشر وبداية القرن العشرين قام إيميل هانسن Emil Hansen بعملية الإنتاج على نطاق واسع لمزارع البادئات المستخدمة في صناعة المنتجات اللبنية المتخمرة.

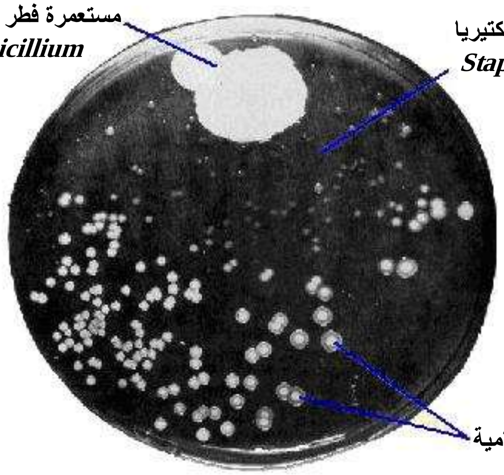
الشكل رقم (9) صورة الجراح الإنجليزي جوزيف لستر Joseph Lister.

الشكل رقم (10) صورة لعالم المناعة الروسي متشنكوف Metchnikoff.

وقبل أن نختم هذا التسلسل التاريخي لبعض أهم الأحداث والشخصيات التي كان لها دور في اكتشاف ودراسة الأحياء المجهرية وتأسيس ذلك العلم الذي عرف بعلم الأحياء المجهرية Microbiology لابد من الإشارة إلى ذلك الاكتشاف الذي شكل ثورة في عالم الطب وهو اكتشاف المضادات الحيوية، حيث اكتشف البنسلين بطريق الصدفة سنة 1928م على يد الميكروبيولوجي الإنجليزي الكسندر فلمنج Alexander Fleming، الذي تظهر صورته في الشكل رقم (11).

وفي هذه الحادثة الشهيرة نمى فطر البنسيليوم ***Penicillium*** على طبقه الذي كان ينمي فيه بكتيريا ***Staphylococcus aureus*** (والتي كان يبحث عن مادة كيميائية قاتلة لها) بعد تركه لهذا الطبق فترة من الزمن سمحت بنمو ذلك الفطر حيث أدى ذلك إلى تثبيط نمو البكتيريا، وهذا ما يوضحه الشكل رقم (12).

الشكل رقم (11) صورة للميكروبيولوجي الإنجليزي الكسندر فلمنج **Alexander Fleming**.



الشكل رقم (12) صورة لطبق فلمنج **Fleming** الذي قاده إلى اكتشاف البنسلين.

وقد تميزت هذه الفترة التي تلت اكتشاف فلمنج للبنسلين بالأبحاث المكثفة على ميكروبات التربة التي لها القدرة على إنتاج مضادات حيوية جديدة، ولذلك يطلق على هذه المرحلة عهد المضادات الحيوية. ونتيجة الاحتياج للبنسلين أثناء الحرب العالمية الثانية حدث تقدم كبير في تقنيات الهندسة الكيماوية مما أدى إلى حل المشاكل التي كانت تواجه إنتاج البنسلين حيث استخدمت المزرعة الهوائية المغمورة (**Submerged Culture**) في مخمرات يتم تهويتها ميكانيكياً في عام 1941م، ثم تبع ذلك اكتشاف الإستربتومايسين على يد واكسمان **Selman Waksman** عام 1944م.

ثم توالت الأبحاث والدراسات والاكتشافات على أيدي العديد من العلماء والباحثين الذين لا يتسع المجال هنا لذكرهم جميعاً، وقد أدت هذه الاكتشافات والأبحاث إلى تطورات متلاحقة وسريعة شكلت معالم علم الأحياء المجهرية **Microbiology** الحديث بكل فروعه الكثيرة التي نعرفها في عصرنا الحالي.

الفصل الثاني
الأحياء المجهرية ذات الأهمية في الأغذية

يعتبر الغذاء بما يحتويه من العناصر الغذائية **Nutrients** وسط غذائي وبيئة طبيعية ملائمة لنمو وتكاثر العديد من الأحياء المجهرية التي عند نموها فيه تحدث مجموعة من التغيرات التي قد تكون مفيدة كتحويل الحليب إلى لبن متخمر أو كما في صناعة الخبز...الخ، أو قد تجعل من هذا الغذاء غير مرغوب فيه من قبل المستهلكين (غير صالح للاستهلاك)، كما قد يسهم الغذاء المتداول بصورة غير سليمة بنقل الأحياء المجهرية المرضية أو سمومها مسبباً ضرر للمستهلك.

وفي هذه العجالة سوف يتم التركز على أهم مجاميع الأحياء المجهرية ذات الأهمية في الأغذية (فكل منها تدرس في مقرر مستقل) وهذه المجاميع تتمثل في الفيروسات (التي لا تصنف ضمن الكائنات الحية) والبكتيريا والفطريات التي تشمل الأعفان (الفطريات الخيطية) والخمائر، مع التعريج على بشكل سريع على بعض الأحياء التي تشكل أهمية في مجال الأغذية كالطحالب والطفيليات المنتقلة عن طريق الغذاء.

وقبل الخوض في تفاصيل مجاميع الأحياء المجهرية ذات الأهمية في الأغذية لابد أن نتعرف على أسس تصنيف هذه الأحياء المجهرية، فلا يمكن دراسة أي نوع من الأحياء المجهرية دون البدء بتعريفها ومعرفة اسمها وموقعها بين مجاميع الأحياء المجهرية الأخرى.

ويهتم علم تصنيف الأحياء المجهرية بعملية تعريف **Identification**، وتسمية **Nomenclature** وتقسيم **Classification** الأحياء المجهرية ضمن مجاميع متماثلة، بحيث يشمل ذلك وصف أنواع (**Species**) هذه الأحياء وتعريفها وترتيبها في فئات أو مجاميع تصنيفية (**Taxa**) ضمن جنس **Genus** ينتمي إلى عائلة **Family** تنتمي إلى رتبة **Order** تنتمي إلى صنف **Class** ينتمي إلى قسم أو شعبة **Division or Phylum** ثم مملكة **Kingdom** ضمن مجال **Domain** محدد وذلك طبقاً لقواعد ومعايير علمية محددة متفق عليها.

ومنذ أن بدء الإنسان دراسة ما حوله من الموجودات التي خلقها الله تعالى، صنفها إلى مجموعتين رئيستين هما الكائنات الحية والجمادات، وفي ذلك اعتمد على أهم الصفات التي تتميز بها الكائنات الحية عن الجمادات وهي قدرة الكائنات الحية على:

1- النمو والتكاثر.
2- الأيض وإنتاج الطاقة.
3- التخلص من الفضلات والمواد الضارة.
4- التكيف والاستجابة لتغيرات البيئة المحيطة.
5- قابليتها للّتطفر والتغير في الصفات الوراثية.

ثم قام الإنسان بدراسة المخلوقات الحية من حوله وصنّفها، وكان أول من بدأ في تصنيف الكائنات الفيلسوف اليوناني أرسطو، وحتى منتصف القرن التاسع عشر كانت كل الكائنات الحية (بما فيها الأحياء المجهرية) تقسم إلى مملكتين هما المملكة النباتية **Kingdom Plantae** والمملكة الحيوانية **Kingdom Animalia** وذلك على أساس الفروق الواضحة بين تلك الكائنات من حيث الشكل والتركيب وطريقه التغذية، فالكائنات المنتمية إلى المملكة النباتية تستطيع بناء غذائها بنفسها (ذاتية التغذية)، وخلاياها محاطة بجدار خلوي، كما أنها غير متحركة، في حين أن الكائنات المنتمية إلى المملكة الحيوانية تختلف عنها في تلك الصفات. وكـــــان العالم كارل فون لينيه **Carl von Linnè** (كارلوس لينيوس **Carlos Linnaeus**) (1758م) ألف كتاب النظام الطبيعي **Systema Naturae** الذي وضع فيه أساس التصنيف العلمي الحديث من خلال نظام التسمية الثنائية **Binomial Nomenclature System** للنباتات، وقد استُعمل هذا النظام لتسمية الحيوانات الأحياء المجهرية، ولا زال هذا النظام مستعمل حتى وقتنا هذا.

الشكل رقم (13) لوحة فنية للعالم كارل فون لينيه **Carl von Linnè** الذي وضع نظام التسمية الثنائية **Binomial Nomenclature System**، في الأكاديمية الملكية السويدية للعلوم مرسومة عام (1778م).

وقد وضع لينيوس ثلاثة مبادئ أساسية لنظام التصنيف وهي:

1- مبدئ استعمال اللغة اللاتينية في تسمية أنواع الكائنات الحية.

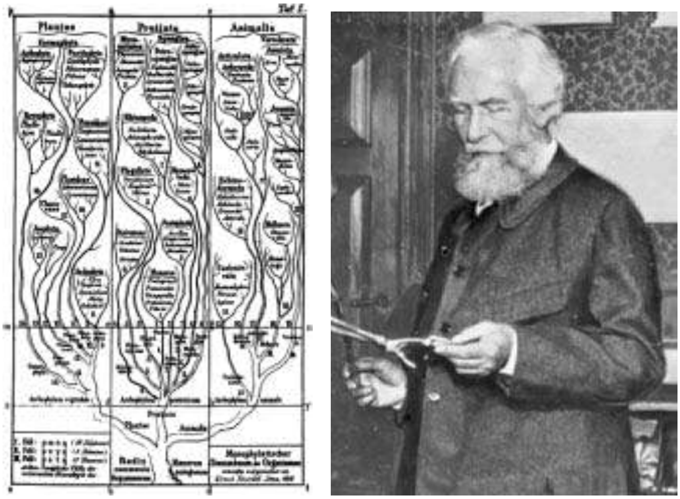
2- مبدئ استعمال نظام التسمية الثنائية **Binomial Nomenclature** لوصف الكائن الحي، فكل نوع من الكائنات الحية يطلق عليه اسم (الاسم العلمي) مكون من كلمتين يجب أن تكونا مشتقتان من اللغة اللاتينية أو اليونانية وإن لم تكونا كذلك يجب أن تعاملا معاملة لاتينية، ويكتب عادة أول حرف من الكلمة الأولى وهى التي تشير إلى اسم الجنس **Genus** بحرف لاتيني كبير **Capital letter**، في حين تكتب جميع أحرف الكلمة الثانية التي تشير إلى اسم النوع **Species** بأحرف صغيرة، كما تكتب كلا الكلمتين بأحرف مائلة أو يوضع تحتها خط كما في الأمثلة التالية: ***Genus species*** أو **Genus species**.

3- مبدئ استعمال المراتب Categories (فئات أو مجاميع تصنيفية Taxa) وهي مرتبة من الأكبر إلى الأصغر كالتالي:

Domain	**مجال أو نطاق**
Kingdom	**مملكة**
Division or Phylum	**قسم أو شعبة**
Subdivision or subphylum	**تحت قسم أو تحت شعبة**
Class	**صنف** هو مجموعة من الرتب المتشابهة.
Subclass	**تحت صنف**
Order	**رتبة** (تسمى باسم إحدى العائلات الرئيسة وتنتهي بالأحرف ales) تضم مجموعة من العائلات المتشابهة أو المتقاربة.
Suborder	**تحت رتبة** (تسمى باسم إحدى العائلات الرئيسة وتنتهي بالأحرف ineae)
Family	**عائلة** (تسمى باسم أحد الأجناس الرئيسة وتنتهي بالأحرف aceae) هي مجموعة تضم الأجناس المتشابهة أو المتقاربة.
Genus	**جنس** مجموعة تشمل الأنواع التي تتميز بصفات ثابتة وغير متغيرة بينها وبين بعضها علاقة وراثية، حيث أن تجميع عدة أنواع تحت جنس واحد يجب أن يتم تبعاً للتشابه في الصفات الطبيعية الثابتة التي ترجع إلى تطابق التركيب الوراثي للأنواع.
Species	**نوع** مجموعة تشمل كل الأحياء المتشابهة في جميع صفاتها، وقد أجمع العلماء على أن الصفات التي يمكن تقسيم النوع على أساسها يجب أن تكون ثابتة وغير متغيرة.
Subspecies or Variety	**تحت نوع** مجموعة توجد عندما تكون هناك فروق بسيطة بين أفراد النوع الواحد بدرجة لا تكفي لوضع كل منها في نوع مستقل بذاته.

وإلى ذلك الوقت كانت الأحياء المجهرية تصنف ضمن أفراد المملكة النباتية Kingdom Plantae حيث وضعها لينيوس Linnaeus ضمن جنس واحد أسماه *Chaos*، وذلك نظراً لأن كثير من مجاميعها تشابه أفراد المملكة النباتية الأخرى من حيث قدرتها بناء غذائها بنفسها (على الرغم من وجود مجاميع كبيرة من البكتيريا غير ذاتية التغذية)، كذلك فالأحياء المجهرية جدار خلوي صلب يقع خارج الغشاء السيتوبلازمي وبذلك تكون أشبه بأفراد المملكة النباتية، كما أن كثير من الأحياء المجهرية تشابه النبات في كونها تحلل الغذاء الصلب خارج الخلية بوساطة إنزيمات موجودة على الجدار الخلوي، ولا تمتلك بعضها نظام هضم كما في أفراد المملكة الحيوانية، ولكن لكون بعض الأحياء المجهرية مثل البروتوزوا أكثر شبهاً بأفراد المملكة الحيوانية فقد ضمت لهذه المملكة، وهكذا فقد قسمت الأحياء المجهرية بين المملكتين النباتية والحيوانية.

ونظراً لما لوحظ من أن الأحياء المجهرية تشمل كائنات تشبه النباتات وكائنات أخرى تشبه الحيوانات وكائنات أخرى لها صفات مشتركة لكل من النباتات والحيوانات وهذه لا يمكن إدراجها في أي من المملكة النباتية أو المملكة الحيوانية لذلك اقترح العالم **Ernst Haeckel** عام 1866م مملكة ثالثة هي مملكة الأوليات **Kingdom Protista** لكي تشمل كل الأحياء المجهرية مثل البكتيريا **Bacteria** والفطريات **Fungi** والطحالب **Algae** والبروتوزوا **Protozoa** وكل الكائنات التي شملتها مملكة الأوليات هذه تتميز بكونها وحيدة الخلية وقد تكون متعددة الأنوية أو عديدة الخلايا دون ما تمييز لأعضاء أو أنسجة معينة، أي أنها أنواع من الخلايا مختلف تماماً عن الأنواع التي كانت معروفة من ناحية التركيب والوظيفة.

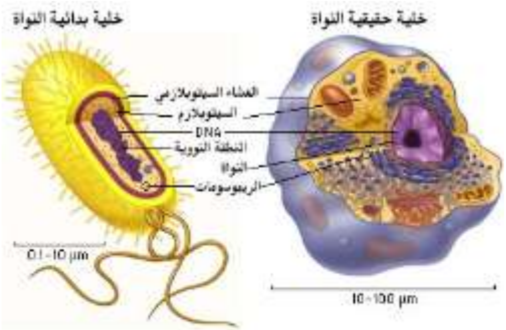


الشكل رقم (14) العالم **Ernst Haeckel** الذي اقترح مملكة الأوليات **Protista**، ومخططه لشجرة الممالك الثلاث للكائنات الحية **(Plantae, Protista, Animalia)**، عن **(Margulis and Chapman, 2009)**.

ونتيجة للتطور العلوم البيولوجية وتطور دراسة الخلية الحية وتركيبها فقد تم تمييز النواة **Nucleus** في الخلية الحية إلى نوعين من الأنوية هما:

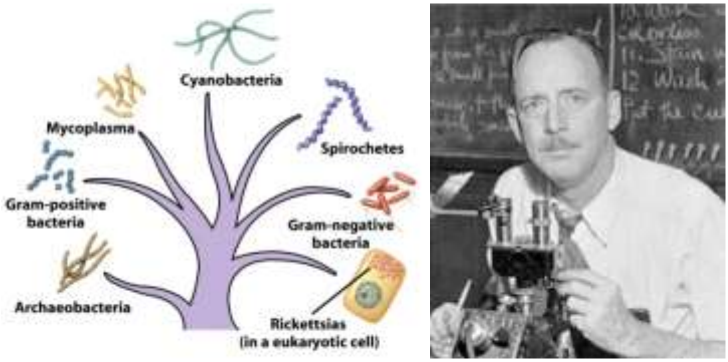
1- النواة البدائية **Prokaryote**: وهذا النوع من الأنوية يوجد فقط في البكتيريا على هيئة خيط مزدوج واحد من الحمض النووي **DNA** يلتف حول نفسه في السيتوبلازم وغير محاط بغلاف نووي أو أية تراكيب نووية أخرى.

2- النواة الحقيقية **Eukaryote**: وهذا النوع من الأنوية يوجد في معظم الكائنات الحية وتتكون من الغلاف النووي والمادة الكروماتينية والعصير النووي، ومن الأحياء المجهرية التي تتواجد فيها هذا النوع من الأنوية الفطريات **Fungi** والطحالب **Algae** والبروتوزوا **Protozoa**.



الشكل رقم (15) الفروق بين الخلايا بدائية النواة **Prokaryotic cells** وحقيقية النواة **Eukaryotic cells**.

أن هذه الحقائق العلمية دفعت العالم **Copeland** في عام **1938**م إلى استحداث مملكة رابعة جديدة تسمى مملكة مونيرا **Kingdom Monera** تضم الكائنات الحية بدائية النواة وهى البكتيريا والسيانوبكتيريا وسميت هذه المجموعة بالكائنات بدائية النواة **Prokaryotes** وبذلك انفردت مملكة الأوليات **Kingdom Protista** بمجموعة الفطريات **Fungi** والطحالب **Algae** والبروتوزوا **Protozoa** وجميعها من الكائنات حقيقية النواة **Eukaryotes**.



الشكل رقم (16) العالم **Copeland** الذي اقترح مملكة مونيرا **Kingdom Monera**، ومخطط توضيحي للكائنات الحية بدائية النواة التي تشملها هذه المملكة، عن (**Margulis and Chapman, 2009**).

وعلى الرغم من معالجة نظام التقسيم الرباعي لممالك الأحياء الذي وضعه العالم **Copeland** إلا أن مشكلة تباين طبيعة التغذية في مملكة الأوليات **Kingdom Protista**، حيث أن الطحالب ذاتية التغذية (بواسطة عملية البناء الضوئي) أما الفطريات فهي غير ذاتية التغذية وتعتمد على مصادر أخرى للتغذية، مما دفع العالم **Whittaker** في عام **1969**م إلى فصل مجموعة الفطريات من مملكة الأوليات وأستحدث لها مملكة منفصلة سميت مملكة الفطريات **Kingdom Fungi (Myceteae)** وانفردت مملكة الأوليات بمجموعة الطحالب **Algae** والبروتوزوا **Protozoa**، وقد أطلق على هذا التقسيم بالتقسيم الخماسي لممالك الأحياء.

وقد أصبح الآن التقسيم الخماسي هو الأكثر شيوعا في العلوم البيولوجية، ويقسم عالم الأحياء إلى مملكة للكائنات بدائية النواة وأربع ممالك للكائنات حقيقية النواة كما يلي:

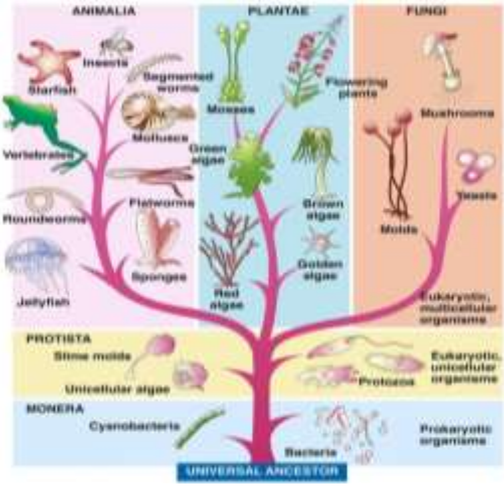
1- المملكة الحيوانية **Kingdom Animalia**

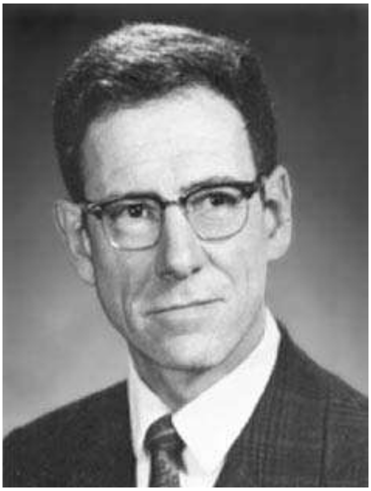
2- المملكة النباتية **Kingdom Plantae**.

3- مملكة الفطريات **Kingdom Fungi (Myceteae)**.

4- مملكة الأوليات **Kingdom Protista**.

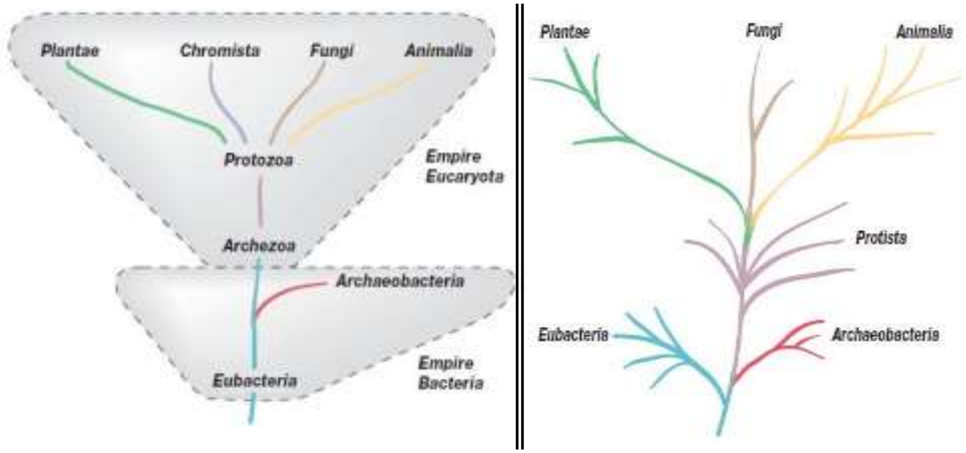
5- مملكة الكائنات بدائية النواة **Kingdom Prokaryotae (Monera)**.





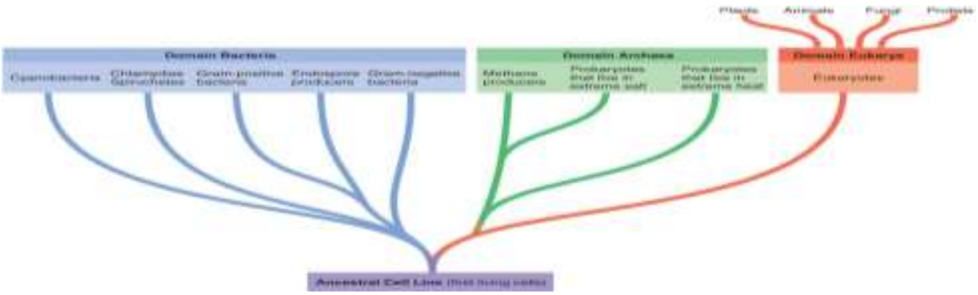
الشكل رقم (17) **Whittaker** الذي اقترح مملكة الفطريات، عن **(Margulis and Chapman, 2009)** ومخطط يوضح نظام التقسيم الخماسي لممالك الأحياء.

وقد ظهرت تقسيمات أخرى بعد التقسيم الخماسي قسمت ممالك الأحياء إلى ست ممالك (حيث فُصلت مملكة الكائنات بدائية النواة **Prokaryotae** إلى مملكتين هما مملكة **Eubacteria** و مملكة **Archeobacteria** إضافة إلى الأربع الممالك الأخرى في نظام التقسيم الخماسي)، كما ظهر نظام التقسيم ذو الثماني ممالك الذي اقترحه **Cavalier-Smith** عام **1987**م حيث أضاف إلى الممالك الست السابقة مملكتين جديدتين هما مملكة **Archezoa** والتي ضمت الكائنات وحيدة الخلية حقيقية النواة التي يفتقر تركيبها إلى أجسام جولجي والكلوروبلاست أو الميتوكوندريا، وكذلك مملكة **Chromista** والتي تضم الكائنات الممثلة للضوء **Photosynthetic** التي تكون البلاستيدات فيها داخل صفائح الشبكة الإندوبلازمية بدلاً من انتشارها في السيتوبلازم مثل الدياتومات والطحالب البنية ومجموعة الأَوالِي البَحْرِيَّة (المُساتِرات) **Cryptomonads**.

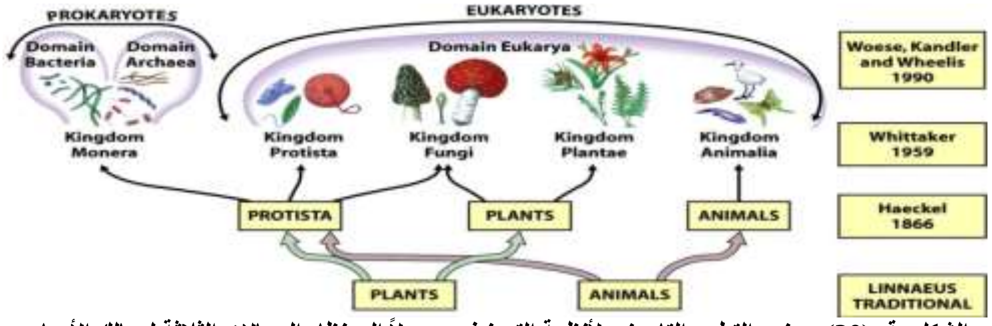


الشكل رقم (18) نظام التقسيم السداسي لممالك الأحياء (يمين)، نظام التقسيم الثماني لممالك الأحياء (يسار)، عن (Prescott, *et al.* 2002).

وحديثاً اقترح كل من Woese و Kandler و Wheelis في عام 1990م وضع جميع ممالك الكائنات الحية ضمن ثلاثة مجالات بحيث شملت مملـــكة الكائنات بدائية النواة Kingdom Prokaryotae (Monera) اثنين من تلك المجالات فقد وضعت ضمن البكتيريا مجالين أو نطاقين (Domain) رئيسين هما البكتيريا Bacteria والأركيا Archaea، في حين شمل المجال الثالث وهو الإيوكاريا Eukarya بقية الممالك الأربعة الأخرى.



الشكل رقم (19) مخطط تفصيلي للمجالات (النطاقات) الثلاثة (Bacteria و Archaea و Eukarya).



الشكل رقم (20) يوضح التطور التاريخي لأنظمة التصنيف وصولاً إلى نظام المجالات الثلاثة لممالك الأحياء.

كما أقترح العالمان Sogin و Patterson عام 1992م تقسيم سباعي الممالك وضعا فيه الكائنات الحية مجموعتين رئيستين هما مجموعة Prokaryotae (وضمت مملكتين هما مملكة Eubacteria ومملكة Archeobacteria) وكذلك مجموعة Eucaryota (وضمت ممالك Animalia و Plantae و Eumycota (الفُطْرِيَّاتُ الحَقيقِيَّة) و Protozoa و Chromista.

ويعتبر علم تصنيف الأحياء المجهرية Microbial Taxonomy من أكثر العلوم تغيراً وتجدداً، حيث أنه دائم التعديل والتغيير والإضافة وذلك نتيجة تجدد المعلومات وتطور العلوم الخاصة بدراسة تلك الأحياء المجهرية.

الفيروسات Viruses ذات الأهمية في الأغذية:-

تعتبر الفيروسات عوامل خلوية تختلف اختلافاً كبيراً عن سائر الكائنات الحية الأخرى فهي لا تملك من صفات الحياة إلا التضاعف والذي يحدث عندما تصيب أو تتطفل على الخلايا الحية فهي عوامل ممرضة غير حية (طفيليات داخل خلوية إجباراً)، وقد ظهرت دلائل عديدة على وجود هذه العوامل الخلوية والأمراض التي تتسبب بها منذ تاريخ مبكر إلا أن أول دليل على وجود الفيروسات قدمه العالم الروسي ديمتري ايفانوفسكي **Dimetry Ivanovski** عام **1892**م من خلال أبحاثه على مرض تبرقش التبغ التي جاءت مكملة لأبحاث العالم الهولندي أدولف ماير **Adolf Mayer** عام **1886**م الذي استطاع أن ينقل مرض تبرقش التبغ إلى نباتات سليمة عندما رشح عصير النبات المصاب ثم مسح الراشح على أوراق نباتات سليمة فظهر المرض عليها، لكن ماير **Mayer** لم يكتشف أي بكتيريا مسببه للإصابة، في حين أشار ايفانوفسكي **Ivanovski** أن عصير النبات المصاب المرشح بمرشحات تحجز البكتيريا يكون قادر على إحداث المرض إلا أنه لم يستطيع فهم مغزى ذلك إلى أن قام العالم الهولندي بيجيرينك **Martinus Beijerinck** عام **1898**م بإعادة تجارب ايفانوفسكي واقترح أن المسبب إما بكتيريا صغيرة تمر عبر المرشحات أو سم وبالتالي أقترح بأن يسمى المسبب **Vivum fluidum contagiosum** (السائل الحي المعدي) وفي نفس الفترة تمكن كل من فريدريك لوفلر **F. Loeffler** وبول فروسك **B. Frosch** من اكتشاف فيروس الحمى القلاعية (مرض القدم والفم **Foot and mouth disease**) الذي يصيب الماشية وأثبتا أنه يمكن نقله إلى الحيوانات السليمة من مادة مستخلصة من الحيوان المصاب بعد ترشيح هذه المادة خلال مرشح بكتيري، وأطلاقا على المسبب أسم العوامل عالية الترشيح **Ultra-filterable Agents**. وفي تلك الأثناء أُقترح اطلاق تسمية فيروس **Virus** على تلك العوامل الممرضة القابلة للترشيح بالمرشحات البكتيرية، وهي كلمة لاتينية تعني سم.

وقد تم اكتشاف الفيروسات لاقمات البكتيريا **Bacteriophage** عن طريق الطبيب الإنجليزي تورت **Twort** عام **1915**م عندما حاول زراعة القيح **Pus** الناتج عن بثرات مريض مصاب بفيروس الجدري على طبق أجار لكن لم يحدث نمو للفيروس (فهو بحاجة إلى خلايا حية لكي ينمو) وعوض عن ذلك نمت بكتيريا عنقودية **Staphylococci** كانت ملوثة لبشرة المريض، وقد لاحظ أن البكتيريا النامية بكثافة تخللها وجود ما يشبه الثقوب وهي مناطق رائقة شفافة خالية من النمو البكتيري **Plaques** على خلفية معتمة من البكتيريا النامية نتيجة تحلل البكتيريا بواسطة هذه الفاجات المحللة للبكتيريا التي قد وصفها العالم الفرنسي فيليكس دهيريل

Felix d'Herelle بأنها الفيروسات التي عند إضافتها إلى البكتيريا على أجار تنتج مناطق من البكتيريا الميتة. ثم تمكن العالمان ستانلي Stanly عام 1935 وبيست Best عام 1939 من الحصول على بلورات فيروس تبرقش التبغ، وبيّنا أن لهذه البلورات الفيروسية القدرة على التضاعف داخل الخلايا الحية بعكس بلورات بقية المواد الكيميائية السامة، وبهذا يمكن اعتبار الفيروسات بروتينات متبلورة شديدة العدوى، وتتميز عن الكائنات الحية بتخصصها في انتقال الصفات الوراثية عن طريق الأحماض النووية. ثم توالت الأبحاث والدراسات في مجال الفيروسات بحيث أضحى علم مستقل له تاريخه وقواعده وأسسه.

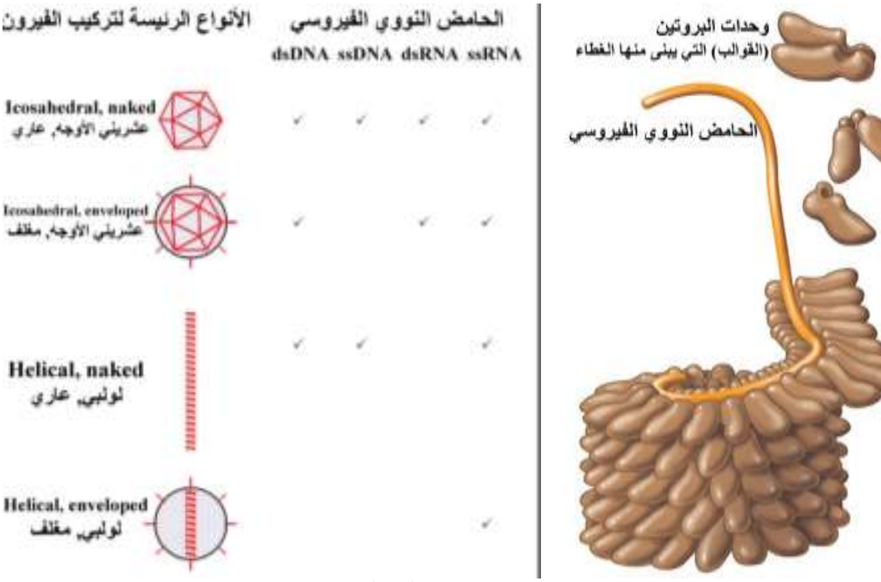
ومن هنا جاءت معرفتنا بأن الفيروسات هي عبارة عن مركبات كيميائية تختلف عن الخلايا من نواحي عديدة، فالفيروسات اصغر من بقية الكائنات الحية الدقيقة ويمكن أن تمر خلال المرشحات البكتيرية، ولا تنمو الفيروسات إلا على خلايا حية وهي متخصصة جداً، ويمكن الحصول عليها في صورة بلورات وقطرها يتراوح بين 8 - 10 ميكرون. وكل جسيم فيروسي (فيرون) منها يتألف من نمط وأحد من الأحماض النووية DNA أو RNA محاطاً بغطاء بروتيني (يدعى كابسيد Capsid) يتكون بدوره من وحدات تعرف باسم Capsomeres، تترتب وفق نظام خاص (الفيرون العاري)، وفي بعض الحالات بطبقة أو غلاف خارجي يحتوي على الكربوهيدرات والليبيدات (الفيرون المحاط بغلاف آخر Envelope)، ووجود نمط واحد من الحامض النووي (DNA أو RNA وليس كلاهما) هو أحد الخصائص المهمة التي تميز الفيروسات عن الخلايا، كما أن الحامض النووي للفيروس قد يتواجد على شكل مفرد أو مزدوج الضفيرة لكلا النوعين سواء الـ DNA أو RNA. وأهم ما يميز الفيروسات هو انتظام وحداتها بأشكال وأحجام خاصة تنتج عن التنظيم الفراغي للبروتينات (الكابسيدات) المحيطة بالحامض النووي الفيروسي، وقد أوضحت صور الميكروسكوب الإلكتروني أن أغلب الفيروسات تكون لولبية الشكل Helical أو عديدة الأوجه Polyhedral، ويمكن تصنيفها وفق الأنماط التالية:

1- فيروسات ذات تناظر لولبي أو كابسيدات لولبية (معظم الفيروسات النباتية).

2- فيروسات ذات تناظر مكعبي أو كابسيدات عديدة الوجوه.

3- فيروسات ذات كابسيدات معقدة، وهي نوعين الأول لا يحتوي على كابسيد محدد واضح بل أغلفة عديدة بروتينية تحيط بالحمض النووي (مثل فيروس الجدري Poxviruses وفيروس الأنفلونزا Influenza viruses)، أما النوع الثاني فيتمثل في لاقمات البكتيريا Bacteriophages وتتكون من رأس يحوي الحامض النووي وذيل يضم ملحقات مختلفة.

4- فيروسات ذات فيريونات غير كاملة.



الشكل رقم (21) ترتيب الحامضِ النووي والغطاء البروتيني في فيروس تبرقش التبغ الحلزوني العاري (يمين) عن (Madigan, *et al*. 2012)، الأنواع الرئيسة لتركيب الجسيمات الفيروسية (الفيرونات) يسار، عن (Carter and Saunders, 2007).

أن أحد السمات المهمة التي تميز الفيروسات عن الخلايا هي افتقاد الفيروسات للمكونات الضرورية لتوليد الطاقة وتخليق البروتين، رغم احتواء بعض الفيروسات فعلا على أنزيمات تشترك في بناء الحامض النووي، إلا أن قدراتها الإنزيمية تكون محدودة جدا ومحصورة بالإنزيمات التي تشترك في دخول الفيروسات للخلايا وتضاعف الحامض النووي الفيروسي، وبسبب قصورها الأيضي فان الفيروسات غير قادرة على التضاعف بمفردها ولابد لها من اختراق الخلية الحية واستثمار الريبوزومات الخلوية ومصادر الطاقة وبعض المكونات الأخرى لخلية المضيف لكي تولد فيرونات جديدة، وبذلك فهي أصغر تركيب (كِيَان) حيوي **Biological entity** له القدرة على تكرار نوعه **Replication** وذلك لاحتوائه على الصفات الوراثية اللازمة للتضاعف داخل خلايا المضيف. وعملية التضاعف الفيروسي **Viral replication** تسبب تغييرات جسيمة في خلية المضيف حيث تؤدي على الأغلب إلى موت الخلية.

وكون الفيروسات لا تعتبر كائنات حية لأنها لا تستطيع التكاثر بصفة مستقلة، وبالتالي فلا يمكن أن يدمج تصنيفها مع تصنيف الكائنات الحية، ما دفع إلى إنشاء تصنيف خاص بها. وقد طورت اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات (ICNV) **International Committee on Nomenclature of Viruses** نظام التصنيف الموحد للفيروسات، حيث اعتبرت الأنواع الفيروسية أدنى مرتبة في التصنيف الهرمي الفيروسات.

وقد وضع بعض العلماء (الذين يعتقدون فرضية تطور الخلايا) فرضيات عديدة تحاول تفسير نشأة الفيروسات، نصت إحداها على أنه ربما كانت الفيروسات خلايا صغيرة تتطفل على الخلايا الأكبر. بمرور الوقت، فقدت الجينات التي لا تحتاج إليها في التطفل. يدعم هذه الفرضية بكتيريا الريكتسيا والكلاميديا التي هي خلايا حية يمكنها التكاثر فقط داخل خلية مضيفة مثل الفيروسات. واعتمادها على التطفل من المحتمل أن يكون هو سبب خسارة الجينات التي تمكنها من البقاء على قيد الحياة خارج الخلية، وتسمى هذه الفرضية فرضية التقهقر أو الانحطاط (أي أن الفيروسات نشأت نتيجة تطور رجعي لكائنات دقيقة كانت تعيش معيشة حرة، فأصبحت كائنات متطفلة على الحياة الخلوية وتطورت رجعيا لتفقد أشكالها وتراكيبها الأصلية ثم أصبحت جزيئات متطفلة إجبارياً على كائنات أخرى). وهناك فرضية تدعى فرضية المنشأ الخلوي وتنص على أن بعض الفيروسات قد تطورت من أجزاء من الأحماض النووية DNA أو RNA لجينات وراثية لكائنات أكبر وتسمى أحيانا فرضية التشرد. وهناك فرضية ثالثة تدعى فرضية التطور المشترك تنص على أن الفيروسات قد تكون تطورت من جزيئات معقدة من البروتين والأحماض النووية في نفس الوقت الذي ظهرت للمرة الأولى الخلايا على الأرض وإعتمدت على الحياة الخلوية لعدة ملايين من السنين.

إلا أن كل ما سبق هي مجرد فرضيات لاجتهاد بعض العلماء ولا يعرف كيف نشأت الفيروسات سوى من أبدعها ﴿صُنْعَ اللَّهِ الَّذِي أَتْقَنَ كُلَّ شَيْءٍ إِنَّهُ خَبِيرٌ بِمَا تَفْعَلُونَ﴾ صدق الله العظيم [النمل: 88]، الخالق عز وجل الذي أعطى كل شيء خلقه ثم هدى، يقول تعالى في محكم كتابه على لسان سيدنا موسى عليه وعلى نبينا أفضل الصلاة وأتم التسليم مجيباً على سؤال فرعون الذي سئل عن من هو رب سيدنا موسى وذلك في الآيات 49 إلى 55 من سورة طه:

﴿قَالَ فَمَن رَّبُّكُمَا يَا مُوسَى ﴿٤٩﴾ قَالَ رَبُّنَا الَّذِي أَعْطَى كُلَّ شَيْءٍ خَلْقَهُ ثُمَّ هَدَى ﴿٥٠﴾ قَالَ فَمَا بَالُ الْقُرُونِ الْأُولَى ﴿٥١﴾ قَالَ عِلْمُهَا عِندَ رَبِّي فِي كِتَابٍ لَّا يَضِلُّ رَبِّي وَلَا يَنسَى ﴿٥٢﴾ الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْداً وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلاً وَأَنزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجاً مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾ كُلُوا وَارْعَوْا أَنْعَامَكُمْ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّأُولِي النُّهَى ﴿٥٤﴾ مِنْهَا خَلَقْنَاكُمْ وَفِيهَا نُعِيدُكُمْ وَمِنْهَا نُخْرِجُكُمْ تَارَةً أُخْرَى ﴿٥٥﴾﴾

صدق الله العظيم.

وهنا أسئل أولئك الذين يعتقدون فرضية النشوء والتطور ويضعون الفرضيات التي تحاول تفسير نشأة وتطور الخلايا، لماذا لا تستمر عملية التطور ونشهد في كل حقبة من الزمن ظهور كائنات جديدة أو أنماط جديدة للخلايا أو أشكال جديدة للحياة! ثم أقول لهم حيرتمونا بفرضياتكم فهل تتطور الخلايا أم تتقهقر (بتطور رجعي!) كما تقولون في فرضية التقهقر أو الانحطاط، أم وجدت بفعل فرضية التشرد أم،،،،،،!!، والحقيقة الثابتة التي لا جدال فيها أن تشابه الفيروسات مع باقي الكائنات الحية في التركيب الكيميائي الأساسي لجزيئات الحامضِ النوويِ والبروتينات التي تمكنها من تكرار النوع ماهي إلا دلالة على وحدانية الخالق عز وجل، القائل في محكم كتابه الحكيم ﴿مَا قَدَرُوا اللَّهَ حَقَّ قَدْرِهِ إِنَّ اللَّهَ لَقَوِيٌّ عَزِيزٌ﴾ صدق الله العظيم [الحج: 74].

فالمنادون بفرضية النشوء والتطور هم كغيرهم ممن نادوا بفرضية التوالد الذاتي Spontaneous Generation كما رئينا من قبل حجتهم داحضة ﴿وَالَّذِينَ يُحَاجُّونَ فِي اللَّهِ مِن بَعْدِ مَا اسْتُجِيبَ لَهُ حُجَّتُهُمْ دَاحِضَةٌ عِندَ رَبِّهِمْ وَعَلَيْهِمْ غَضَبٌ وَلَهُمْ عَذَابٌ شَدِيدٌ﴾ صدق الله العظيم [الشورى: 16].

وقد يسئل سائل لماذا خُلقت الفيروسات والإجابة هنا في قول المولى تبارك وتعالى ﴿وَرَبُّكَ يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ وَيَخْتَارُ مَا كَانَ لَهُمُ الْخِيَرَةُ سُبْحَانَ اللَّهِ وَتَعَالَى عَمَّا يُشْرِكُونَ﴾ [القصص: 68]. فتبارك رُبنا جل وعلى القائل:

(تَبَارَكَ الَّذِي بِيَدِهِ الْمُلْكُ وَهُوَ عَلَى كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ ﴿١﴾ الَّذِي خَلَقَ الْمَوْتَ وَالْحَيَاةَ لِيَبْلُوَكُمْ أَيُّكُمْ أَحْسَنُ عَمَلًا وَهُوَ الْعَزِيزُ الْغَفُورُ ﴿٢﴾ الَّذِي خَلَقَ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ طِبَاقًا مَّا تَرَى فِي خَلْقِ الرَّحْمَٰنِ مِن تَفَاوُتٍ فَارْجِعِ الْبَصَرَ هَلْ تَرَى مِن فُطُورٍ ﴿٣﴾ ثُمَّ ارْجِعِ الْبَصَرَ كَرَّتَيْنِ يَنقَلِبْ إِلَيْكَ الْبَصَرُ خَاسِئًا وَهُوَ حَسِيرٌ ﴿٤﴾) صدق الله العظيم [الملك: الآيات 1 - 4].

والفيروسات كما سبق تعريفها بأنها عوامل ممرضة غير حية (طفيليات داخل خلوية إجباراً)، وعليه يمكن تقسيمها تبعاً للكائنات الحية التي تصيبها إلى:

1- فيروسات الإنسان والحيوان.

2- فيروسات النبات.

3- فيروسات الحشرات.

4- فيروسات البكتيريا (لاقمات البكتيريا Bacteriophage).

5- الفيروسات التي تتطفل على أحياء أخرى كالفطريات والأوليات........الخ.

وسوف يتم في هذه الصفحات التطرق (باختصار) إلى الفيروسات ذات الأهمية في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية والتي نقسمها إلى مجموعتين هما: الفيروسات المحمولة عن طريق الغذاء Food-borne Viruses والتي تصيب الإنسان، وكذلك لاقمات البكتيريا (البكتيريوفاج) Bacteriophage التي تؤثر على بكتيريا البادئات المستخدمة في إنتاج الأغذية المتخمرة.

أولاً- الفيروسات المحمولة عن طريق الغذاء Food-borne Viruses: التي من أهمها ما يلي:

1- فيروس التهاب الكبد الفيروسي (أ) Hepatitis A:

هناك عدد من الفيروسات التي تتسبب بالتهاب الكبد الفيروسي كان أولها اكتشافاً هو فيروس التهاب الكبد الفيروسي (أ) Hepatitis A أو المعدي، ثم اكتشف بعده فيروس التهاب الكبد الفيروسي (ب) أو المصلي بعد ذلك ظهرت التهابات كبدية فيروسية كان يطلق عليها اسم الالتهاب الكبدي لا (أ) و لا (ب) لكنها مؤخراً سميت بأسمائها المعروفة حالياً التهاب الكبد الفيروسي (ج)، (د)، (هـ)....الخ. ويعد التهاب الكبد الفيروسي (أ) المصنف ضمن عائلة الفَيْرُوساتُ البِيكُورْناوِيَّة Picornaviridae، من أكثر أشكال التهاب الكبد انتشاراً بالعالم، وتنتقل عدوى الفيروس عن الطريق البرازي - الفموي Fecal Oral Route حيث يفرز الفيروس في براز الأشخاص المصابين وينتقل عن طريق مياه الشرب الملوثة، الخضراوات النيئة الملوثة، المحار المجمع من مياه ملوثة، الأغذية الغير مطبوخة والأغذية التي لم يعاد تسخينها والتي لامست أيدي المصابين بالمرض. وتنتشر الاصابة بهذا الفيروس بين الأطفال دون الرابعة من العمر وغالبا تكون الإصابة دون أعراض واضحة، وفترة الحضانة للمرض تتراوح بين 15 إلى 50 يوم وبمعدل 28 يوم، تبدء أعراض المرض بحمى خفيفة مصحوبة بفقدان شهية وغثيان وألم في البطن واضطراب معوي، ثم تبدأ بعد عدة أيام مرحلة الاصفرار بالجلد والعيون (اليرقان)، ثم تعقب هذه المرحلة مرحلة الشفاء التي قد تستغرق أسابيع يستمر بها تضخم الكبد لبعض الوقت. وتستمر معظم حالات التهاب الكبد الفيروسي (أ) ما بين أسبوعين إلى 3 أشهر. ويمكن تقليل أعراض المرض بتناول حقن جاما جلوبيولين Gamma globulin (IgG) خلال أسبوع من إصابة المريض بالفيروس.

وإضافة إلى التهاب الكبد الفيروسي (أ) Hepatitis A، فإن التهاب الكبد الفيروسي (هـ) Hepatitis E من يعتبر من الأمراض الوبائية المرتبطة بتلوث الأغذية والمياه، حيث أن هذا الفيروس يخرج من جسم المصاب عن طريق البراز فعادة يكون سبب العدوى الأغذية ومياه الشرب الملوثة بمياه الصرف الصحي. تتراوح فترة حضانة الفيروس بين أسبوعين و 9 أسابيع. ويسبب الفيروس (هـ) التهاباً كبدياً حاداً غالباً ما يزول تلقائيا لذلك لا يتم إعطاء أدوية ولكن ينصح المريض بالإكثار من شرب السوائل وتناول غذاء صحي ومتوازن، ويعتبر الأشخاص بين 15 و 40 سنة أكثر عرضة للإصابة به وتكون النساء الحوامل بشكل خاص أكثر المعرضين للإصابة بهذا الفيروس وتكون نسبة الوفاة لديهن أعلى بكثير من غيرهن. ولا توجد أي فروق سريرية بين التهاب الكبد الوبائي (هـ) والتهاب الكبد الوبائي (أ).

2- الفيروسات المعوية Enteroviruses:

تضم الفيروسات المعوية كل من الفيروسات السنجابية Polioviruses التي تؤدي لشل الأطـفال، حيث يتكاثر الفيروس في الجهاز الهضمي للطفل المصاب ويخرج مع البراز فيسهل نقل العدوى للآخرين عن طريق الذباب أو الأيدي الملوثة، والفيروسات الإيكُوِيَّة Echoviruses التي تسبب الالتهاب السحائي، والفَيروسَات الكُوكْساكِيَّة Coxsackievirus وهذه الفيروسات تؤدي إلى أمراض مختلفة كالتهاب السحايا والتهاب الفم والزكام وتسبب الإسهال والتهاب عضلات القلب عند الأطفال الصغار. ويتلوث الغذاء بالفيروسات عن طريق الاشخاص المصابين.

3- روتافيروس Rotavirus:

روتافيروس Rotavirus (الفَيروسَ العَجَلِيَّ أو عامل نورووك Norwalk agent) من أكثر الفيروسات التي تسبب الإسهال، وهو ينتقل عن طريق مياه الشرب الملوثة، المحار المجمع من مياه ملوثة، والأغذية التي لامست أيدي المصابين بالمرض. ويكون الرُضّع والأطفال والقاصرين أكثر عرضة للإصابة بهذا الفيروس وفترة الحضانة للمرض تتراوح بين يوم إلى ثلاثة أيام، وتتلخص أعراض المرض في حدوث قيء، وإسهال مائي وحمى. وتستمر الإصابة بين 4 إلى 8 أيام. ويمكن تجنب الإصابة بهذا الفيروس باتباع القواعد الصحية أثناء إعداد وتناول الطعام. وفي عام 2006م ظهرت لقاحات جديدة فعالة ومأمونة في استخدامها للروتافيروس Rotavirus، وقد أدخلت بلادنا مؤخراً (في أغسطس 2012م) لقاح الروتافيروس Rotavirus ضمن برنامج التلقيح الروتيني للأطفال.

4- فيروسات Noroviruses:

كانت تعرف سابقاً بالفيروسات الصغيرة مستديرة التَرْكِيب، وكذلك الفيروسات شبيهة نورووك Norwalk-like viruses وحالياً من المعروف أنها من الفيروسات المحمولة عن طريق الغذاء، وتُسبّبُ هذه الفيروساتِ التهاب معوي فيروسيَ وبائيَ يُؤدّي إلى حالات تفشّي كبيرةِ. وتنتقل عن طريق المياه الملوثة، وكذلك الخضراوات والفواكه المروية بالمياه الملوثة، والمحار الملوث، وكذلك عن طريق الغذاء المعد من قبل أشخاص مصابين بهذه الفيروسات والأطعمة الجاهزة للأكل والتي لامست أيدي المصابين، وتتراوح فـــترة الحضانة للمرض بين 12 إلى 48 ساعة وتستمر لمدة 24 إلى 60 ساعة، ومن أعراضه الغثيان، التقيؤ، الاسهال، وآلام في البطن وأحياناً يحدث صداع وحمى، ويستعيد الشخص المصاب حالته الطبيعية بعد 2 – 3 أيام.

5- عدوى الفيروس الغدي Adenovirus infections:

الفيروس الغدي Adenovirus من فيروسات الجهاز التنفسي، وقد برهنت الدراسات السريولوجية Serological studies أن الماشية تصاب بالفيروس الغُدي للإنسان الذي لا يستطيع مقامة البسترة. وينقل الفيروس عن طريق الحليب الطازج و تنتج عنه الالتهابات في الجهاز التنفسي و البلعوم و ملتحمة العين.

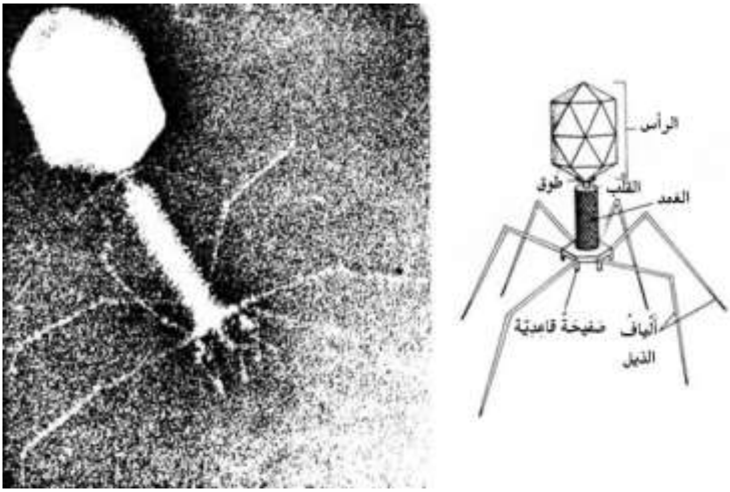
6- فيروس الحمى القلاعية Foot and mouth disease virus:

مرض الحمى القلاعية يصيب الحيوانات مشقوقة الظلف Cleaver footed والفيروس معدي جداً للحيوانات وتبدأ الأعراض بحمى أولاً ثم تتكون حويصلات على الفم والضرع وأعلى الظلف وبين الأصابع عند الإنسان، وعند انفجار الحويصلات تترك أماكن مُعراة Erosions سطحية وأحيانا تتحول إلى قرحة، ويفرز الفيروس في الحليب عند وجوده في الدم أو يلوث الحليب عن طريق الحويصلات الموجودة على الضرع والحلمات، أو عن طريق اللعاب إثناء عملية الحلب. وتتشابه أعراض المرض في الإنسان و الحيوان و عادة ما يكون المرض حاداً في الأطفال الضعفاء.

ثانياً- لاقمات البكتيريا (البكتيريوفاج) Bacteriophage:

تعتبـر الفاجـات أو مـا تسـمى بلاقمـات البكتيريـا (البكتيريوفـاج) Bacteriophage، مـن الفيروسات ذات الأهمية في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية، حيث تؤدي إلى خسائر كبيـرة فـي مجـال صناعة الجبن والألبان المتخمرة فهي تصيب البادئـات وبالتـالي توقف نشـاطها تمامـا ويـؤدي ذلـك إلى فشل تصنيع المنتج اللبني المستخدم فيه البادئ.

وقد تم التعرف على تـأثير البكتيريوفـاج Bacteriophage علـى مزارع البـادئ لأول مـرة عام 1935م، حيث لوحظ وجود بعض العوامل الحيوية (الفيروسات) التي هـي أصـغر مـن البكتيريـا عرفت بالبكتيريوفـاج، وهـي عبـارة عـن فيروسـات تهـاجم وتقضـي علـى مـزارع البـادئ، وتكـون النتيجـــة عـــدم إنتـــاج حـــامض اللاكتيـــك، وتمتـــاز هـــذه الفيروســـات البكتيريـــة (الفاجـــات) Bacteriophage بالتخصص في مهاجمتهـا للبكتيريـا حيث تهـاجم سلالة معينـة ولـيس لهـا أي تأثير على السلالات الأُخرى وبالتالي عدم استمرار فعالية البادئ الحاوي على تلك السلالة لوحدها في حين يستمر البادئ الخليط بفعاليته ولو بشكل أضعف نتيجة عدم تـأثر السلالات الأُخـرى. جميـع الفاجات لها رأس منشوري عديد الأوجه، يتراوح طول مقطعه العرضـي بين 50 – 100 نـانومتر، وهو عبارة عن غلاف بروتيني يوجد بداخله جزئ مفرد مـن الحـامض النـووي ويمـاثـل فـي حجمـه العديد من البلازميدات. في معظم هذه الفاجات يلحق بالرأس ذيل يتكون مـن أنبوبـة مركزيـة لولبيـة (يمر مـن خلالهـا الحـامض النـووي للفـاج عنـد غزو الخليـة البكتيريـة) محاطـة بطبقـة لولبيـة قابلـة للتقلص متصلـة مـن أسـفلها بصـفيحة قاعديـة Base Plate تتصـل بأليـاف ذيليـه رفيعـة وطويلـة، وهذه الألياف هي أعضاء الاتصال بحلية العائل كما يلاحظ من الشكل التالي:

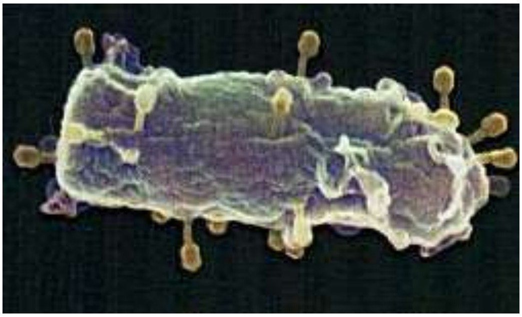


الشكل رقم (22) شكل تخطيطي وصوره بالمجهر الإلكتروني للبكتريوفاج.

وتنطبق على الفاجات (البكتيريوفاجات) **Bacteriophages** الصفات العامة للفيروسات، وهي واسعة الانتشار في الطبيعة وتوجد في كل البيئات التي تتواجد فيها البكتيريا، كما أن معظم أنواع البكتيريا تصيبها الفاجات، ربما عشرات أو مئات لنوع البكتيريا الواحد. ويوجد نوعان رئيسان من البكتيريوفاج، النوع الأول هو الفاجات المحللة **Lytic phages** أو ما تسمى بالفاجات الشرسة **Virulent phages** وهي التي تدمر الخلايا البكتيرية المصابة، أما النوع الثاني فهو الفاجات المعتدلة **Temperate phages** أو غير الشرسة **Avirulent phages** وتبقى الخلايا المصابة بهذا النوع من البكتيريوفاج سليمة. ويمكن أن تدخل هذه الفاجات إلى بكتيريا العائل من خلال نوعين من الدورات هما دورة التحلل **Lytic cycle** والدورة المولدة للتحلل **Lysogenic cycle**.

دورة التحلل Lytic cycle: وتحدث في عدة خطوات رئيسة هي:

<u>(1) الإمتزاز (إدمصاص) الفاج Phage adsorption</u>: وهنا تبدأ دورة التحلل Lytic cycle بامتزاز ذيل الفاج عند مراكز استقبال معينة على سطح الخلية البكتيرية حيث إن الألياف الموجودة عند في نهاية ذيل الفاج هي مواقع إدمصاصها التي ترتبط بمستقبلات معينة على الجدار الخلوي البكتيري، لاحظ الشكل الأتي:



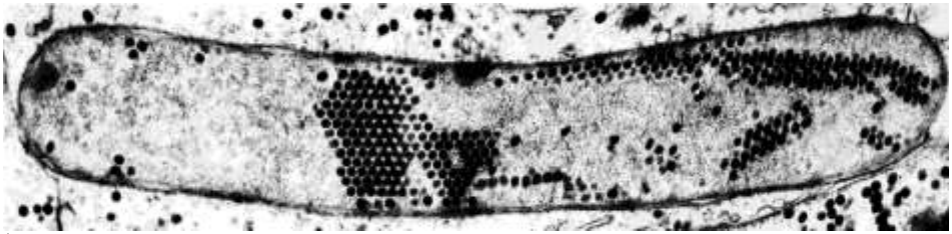
الشكل رقم (23) صوره بالمجهر الإلكتروني توضح إدمصاص البكتيريوفاج على سطح الخلية البكتيرية.

<u>(2) الاختراق Penetration</u>: (حقن الحامض النووي الفيروسي **Nucleic acid injection** داخل الخلية البكتيرية)، **بعد عملية الإدمصاص يقوم إنزيم معين (إنزيم حال Phage Lysozyme) مستقر في ذيل الفاج بتحليل جزء صغير من الجدار الخلوي البكتيري، وبعد ذلك يتقلص غمد ذيل الفاج وعند ذلك يخترق محور الذيل الجدار الخلوي ميكانيكياً، وعندها تفتح قمة ذيل الفاج بحيث يصبح الحامض النووي الفيروسي الموجود في رأس الفاج حر الحركة ليمر عن طريق قناة ذيل الفاج ثم يدخل الحامض النووي الفيروسي ببساطة خلال الجدار الخلوي، ويخترق الغشاء الخلوي ويقتحم داخل الخلية في حين يبقى الغطاء البروتيني للفاج خارج الخلية.**

(3) تضاعف الفاج Phage multiplication: في خلال دقائق يتولى الحامض النووي الفيروسي السيطرة على وظائف الخلية لكي يقوم ببناء الأحماض النووية الفيروسية وبروتينات الفاج لمضاعفة نفسه بمعدل أكبر من خلايا العائل، حيث تتوقف كامل عملية استنساخ الـ RNA من كروموسوم المضيف خلال دقائق من دخول الحامض النووي الفيروسي إلى المضيف، وفي الواقع فان الحامض النووي DNA للمضيف يتحلل بالفعل في غضون دقائق معدودة بعد الإصابة بالفاج، ويكون جميع الـ RNA المنتج فيما بعد هو mRNA مستنسخ من الحامض النووي الفيروسي، وبهذه الآلية يستحوذ الفاج على كل الأيض الخلوي البكتيري لأجل إنتاج أجزاء الفاج (البروتين والحامض النووي الفيروسي)، مع ذلك تستمر إنزيمات المضيف بعملها وتجهز الطاقة المطلوبة لتضاعف الفاج عن طريق مسارات أيض الكربوهيدرات، وتقوم ببناء الوحدات الفرعية للبروتين والحامض النووي للفاج المتضاعف لا بل أنها تشارك أيضاً في تخليق الحامض النووي للفاج وبروتين غطائه، وتحتاج عملية تكوين بروتينات الفاج إلى مشاركة الرايبوزومات البكتيرية، وبالإضافة إلى إنزيمات المضيف المألوفة فان العديد من الإنزيمات التي تظهر في خلية المضيف المصابة تكون خاصة بالفاج أي أنها تشفر في الحامض النووي الفيروسي وغير موجودة في الحامض النووي DNA لخلية المضيف غير المصابة بالفاج، وبغياب هذه الإنزيمات الخاصة بالفاج لا يمكن مواصلة عملية بناء الحامض النووي الفيروسي وبروتين غطائه، ويقوم أحد هذه الإنزيمات الخاصة بالفاج بعملية تحليل الحامض النووي DNA لخلية المضيف ويحفز إنزيم أخر مستحث بالفاج Phage-induced enzyme بناء قاعدة البريميدين (هيدروكسي مثيل سايتوسين) التي تندمج عوضاً عن السايتوسين في الحامض النووي الفيروسي، إضافة إلى ذلك يشفر الحامض النووي الفيروسي لإنزيمات متخصصة بتجميع بروتين كابسيد الفاج. وأثناء تضاعف الفيروس تنفصل المكونات الفيروسية (الحامض النووي الفيروسي والبروتين) تماما عن بعضها الأخر، وفي الواقع فان انفصال الحامض النووي عن غطائه البروتيني الواقي هو واحد من السمات الإجبارية والمميزة لتكاثر الفيروس.

إن أسلوب التكاثر السابق وصفه يعلل حقيقة انه خلال طور واحد من إصابة الفاج (ويدعى فترة الاِحْتِجاب أو الخسوف Eclipse period) لا يمكن العثور على فاجات تامة داخل خلية المضيف، وهكذا إذا ما تمزقت الخلايا البكتيرية أثناء فترة مبكرة من تكاثر الفاج عندئذ يمكن ملاحظة وجود الحامض النووي الفيروسي وغطائه البروتيني الواقي ولا يمكن ملاحظة فيرونات الفاج الكاملة.

(4) النضج Maturation: تتضمن عملية النضج تجمع الحامض النووي الفيروسي وغطائه البروتيني الواقي لتكوين الفيرونات الناضجة الناقلة للعدوى، وهي من العمليات المعقدة المتعددة الخطوات، حيث تتجمع رؤوس وذيول الفاج بصورة مستقلة بواسطة عمليات تدريجية، وحالما يتكون الرأس فانه يرزم مع الحامض النووي الفيروسي ويتصل به الذيل بعد ذلك.

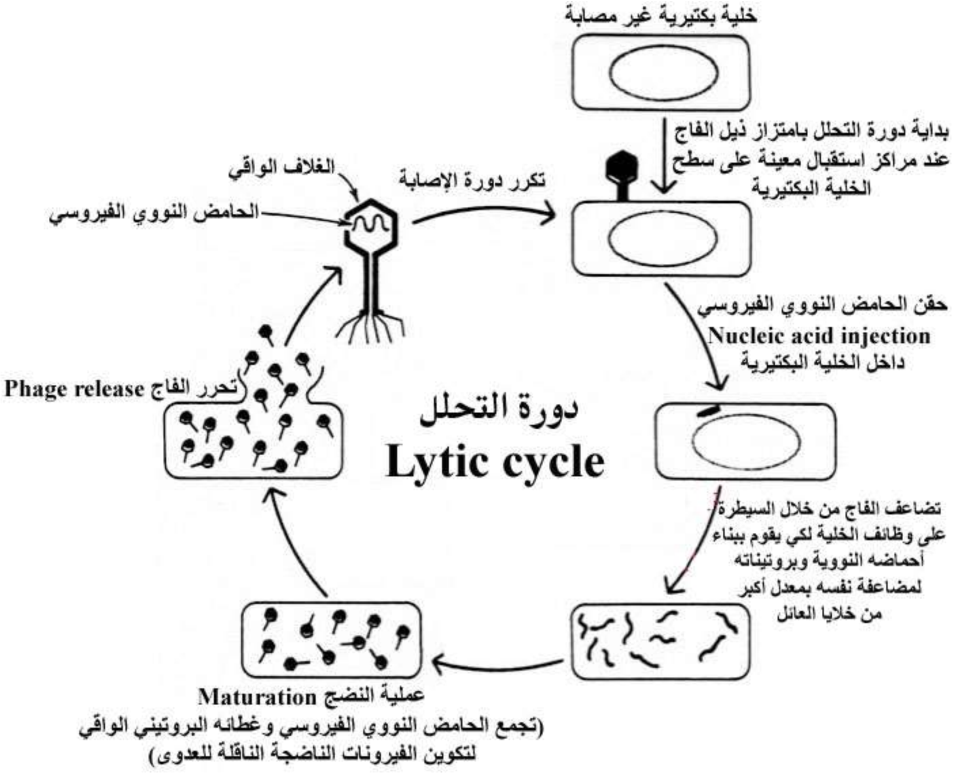


الشكل رقم (24) صورة بالميكروسكوب الإلكتروني توضح انتهاء فترة الاِحْتِجاب وظهور الفيرونات الناضجة داخل خلية بكتيرية مصابة، عن (Prescott, *et al.* 2002).

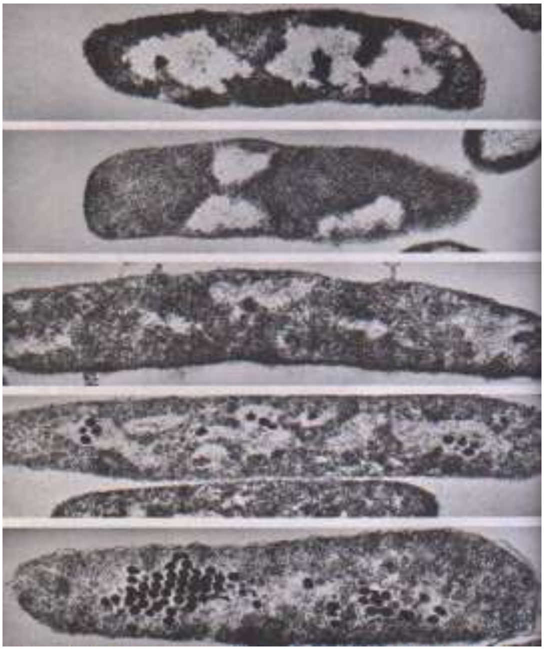
(5) تحرر الفاج Phage release : أثناء الأطوار الأخيرة من فترة الإصابة بالفاج هناك أنزيم فيروسي آخر مستحث يبتدئ بالظهور، وهو الإنزيم الحال **Lysozyme** الذي يحلل جدار خلية المضيف من الداخل مما يؤدي ذلك إلى انحلال الخلية وتحرر العديد من الفيرونات الكاملة للفاج، وهذه الفيرونات المتحررة تصيب الخلايا الحساسة الموجودة في الوسط، وتعاد عملية تضاعف الفيروس، ومن المهم عدم تخليق الإنزيم الحال في بداية عملية الإصابة لأن ذلك يعني تحلل خلية المضيف قبل تكوين أي فيرون ناضج.

الشكل رقم (25) يوضح تحرر الفاجات **Bacteriophages release** من الخلية البكتيرية المصابة.

ويطلق على هذه الفاجات أسم الفاجات الشرسة (الضارية) **Virulent phages**، وتعرف الفترة من الإصابة بالفاج حق انطلاق الفاج بعد تحلل خلايا المضيف بفترة الكمون **Latent period** وعادة تكون قصيرة (45 – 60 دقيقة)، ويكون عدد الفاجات الناتجة عند الانفجار مرتفعاً حيث يصل إلى 200 / خلية، لذلك فإن إصابة الخلايا بمثل هذه الفاجات يمكن أن تؤدى إلى إتلاف قدرة خلايا البادئ على النمو وإنتاج حامض اللاكتيك.



الشكل رقم (26) يوضح دورة التحلل Lytic cycle.



خلية بكتيرية سليمة وقت الإصابة، والمناطق الفاتحة داخل الخلية البكتيرية عبارة عن الكروموسوم البكتيري.

بعد دقيقتين من الإصابة تصبح التغيرات في DNA الخلية البكتيرية واضحة.

بعد ثمانية دقائق من الإصابة يتحطم الكروموسوم البكتيري ثم يتكون الحامض النووي الفيروسي.

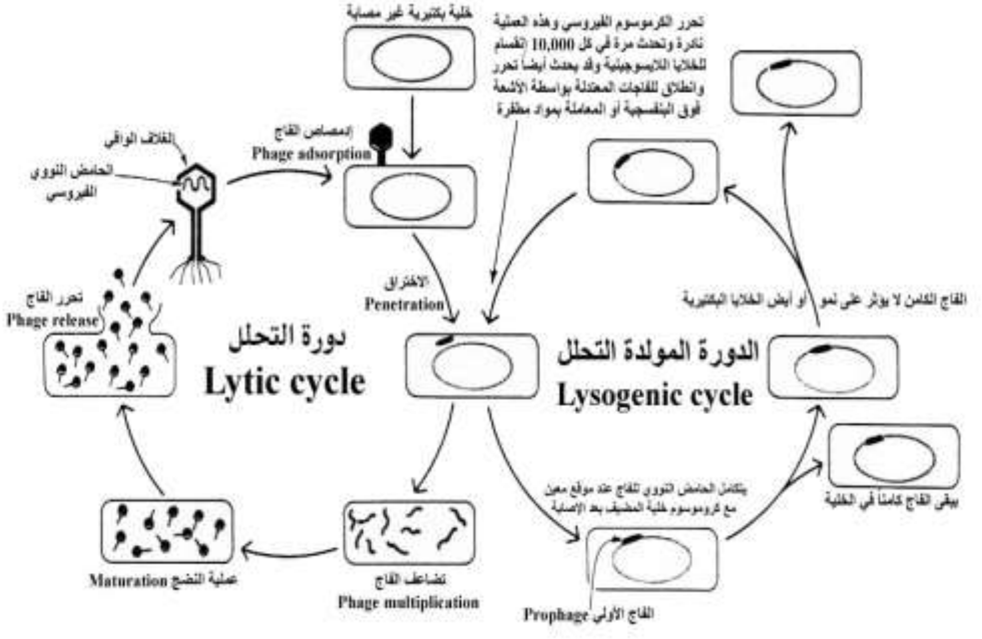
بعد اثني عشر دقيقة من الإصابة يكون الحامض النووي الفيروسي المكثف واضحاً بشكل مناطق داكنة.

بعد 30 دقيقة من الإصابة تكون الخلية البكتيرية مملوءة تقريباً بالحامض النووي الفيروسي المكثف ورؤوس الفاج الكامل يتم بعدها تجمع الفيرونات الناضجة وتحررها.

الشكل رقم (27) مقاطع من خلايا بكتيرية مصابة بنوع من الفاجات الشرسة Virulent phages.

الدورة المولدة التحلل Lysogenic cycle:

إن الدورة المولدة التحلل أو ما تسمى بالدورة اللايسوجينية Lysogenic cycle هي مسار بديل لتكاثر الفاج ويكون إدمصاص الفاج وحقن الحامض النووي الفيروسي في خلية المضيف مماثلاً لما يحدث في دورة التحلل Lytic cycle، لكن بدلاً من أن يتكاثر الفاج فإن الحامض النووي للفاج يتكامل عند موقع معين مع كروموسوم خلية المضيف بعد الإصابة (مكوناً ما يعرف بالفاج الأولي Prophage) ولا يسبب تحلل لخلية المضيف، وتعرف الخلية البكتيرية المحتوية على الفاج الأولي بالخلية اللايسوجينية Lysogenic cell، ويطلق على هذه الفاجات اسم الفاجات المعتدلة Temperate أو غير الشرسة Avirulent phages، وقد يبقى الحامض النووي الفيروسي للفاج مستقلاً بذاته مثل أي من بلازميدات سيتوبلازم الخلية البكتيرية، وقد يبقى هذا الفاج كامناً في الخلية، لذلك فإن المزارع اللايسوجينية Lysogenic culture المحتوية على فاجات حرة لا تؤثر على نمو أو قدرة هذه المزارع على إنتاج الحموضة، ومع ذلك يمكن حثه في معظم الخلايا وانطلاق الفاجات المعتدلة تلقائيا، وهذه العملية نادرة وتحدث مرة في كل 10,000 انقسام للخلايا اللايسوجينية، وقد تحدث بواسطة الأشعة فوق البنفسجية أو المعاملة بمواد مطفرة، ويمكن الكشف عن الفاج المنطلق من الخلايا على فترات باستخدام سلالات حساسة تعرف بالسلالات الكاشفة Indicator strains أو بفحص السائل الرائق بالميكروسكوب الاليكتروني.



الشكل رقم (28) يوضح الدورة المولدة التحلل Lysogenic cycle والتي قد تنتهي بتحرر الفاج.

الفيروئيدات Viroids والفيروسوئيدات Virusoids والبريونات Prions:

الفيروئيدات Viroids من العوامل الحيوية الممرضة غير الحية تتكون من حامض RNA فقط الذي لا يستطيع نسخ نفسه (كما في الفيروسات) ولذلك فهو يعتمد في تضاعفه على مكونات المضيف مستخدماً آلية التخليق الحيوي وأنزيمات الخلية المضيفة، وتتميز الفيروئيدات بأوزانها الجزئية المنخفضة، وتعتمد في تضاعفها على مكونات مضيفها لأنها طفيليات داخلية أيضاً.

أما الفيروسوئيدات Virusoids فتختلف عن الفيروئيدات Viroids في كونها بحاجة إلى مساعدة فيروس آخر لتستطيع إحداث الإصابة للخلية المضيفة ومثال عليها فيروس التهاب الكبد الوبائي (د) Human Hepatitis D Virusoids الذي يحدث الإصابة حيث ينضم إلى الفيروس (ب) Hepatitis B ويدخل عبره إلى الخلايا.

في حين أن البريونات Prions عوامل حيوية مرضية معدية تتكون من بروتينات فقط، تتضاعف داخل خلايا مضيفها بآلية لا تزال غير معروفة تماماً، ومن الأمراض التي تتسبب بها البريونات Prions مرض كورو Kuru الذي يظهر عند أكلي لحوم البشر وهو عبارة عن فقدان توازن ينتهي بالجنون خلال فترة تتراوح بين ثلاثة أشهر إلى سنة، نتيجة أكل أدمغة الموتى، وكانت أخر الحالات لهذا المرض ظهرت في غينيا الجديدة في قبيلة فور Fore وقد شخصت نحو 2600 حالة مصابة بهذا المرض عام 1957م.

ومن الأمراض الأخرى التي تتسبب بها البريونات مرض جنون البقر (اعتلال الدماغ الإسفنجي Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE، وهو واحد من مجموعة الأمراض التي تعرف باسم الاعتلالات الدماغية الإسفنجية شبه الحادة، ومن أمراض هذه المجموعة مرض الدماغ الحمّوي الإسفنجي الذي يصيب الأغنام، ومرض كروتيزفلت ـ جاكوب Creutzfeldt-Jakob الذي يصيب الإنسان.

ويهاجم الاعتلال الدماغي الإسفنجي البقري الجهاز العصبي المركزي للأبقار (ويطلق عليه مرض جنون البقر بسبب السلوك الغريب الذي يبدو على الأبقار المصابة)، حيث يؤثر هذا المرض على الحالة العصبية للأبقار المصابة، وكذا على حواسها وحركتها وهيئتها. وقد شُخِّص هذا المرض أول مرة في المملكة المتحدة عام 1986م، إلا أن الدلائل تشير إلى ظهور أول حالة في أبريل 1985م. ويعتقد العلماء أن سبب هذا المرض هو إطعام الأبقار على العلائق المحتوية على مشتقات حيوانية مصابة. وفي أواخر الثمانينيات بدأت البحوث لاكتشاف كيفية انتشار العدوى بين الحيوانات.

ولم يتفق العلماء حول مدى تأثير أكل لحوم الأبقار المصابة على الإنسان. فمعظمهم يعتقد أن الحيوانات المذبوحة لا ضرر منها إذا ثبت بالفحص خلوها من المرض. وتستبعد أمعاء الحيوان ودماغه ونخاعه الشوكي فلا تؤكل. أما الحيوان الذي تثبت إصابته فإنه يتم التخلص من جثته تمامًا. وفي عام 1996م اكتشف العلماء دلائل تشير إلى وجود علاقة بين مرض جنون البقر ومرض كروتيزفلت - جاكوب **Creutzfeldt-Jakob** (الذي هو نوع نادر من الخرف الذي يدمر خلايا الدماغ، وتتمثل الأعراض الأولى له بفقدان الذاكرة أو السلوك غير الطبيعي. وفي غضون أسابيع تحدث اضطرابات في الرؤية، وقلة التركيز وضعف العضلات ونوبات مرضية أخرى. وتستمر القدرة الذهنية والإدراكية في التدهور، ويتقدم المرض بسرعة ويؤدي إلى الوفاة في غضون عام غالباً)، وقد أكدت منظمة الصحة العالمية **WHO** في عام 1996م انتقال مرض جنون البقر إلى الإنسان عند تناوله لحوم الأبقار المصابة وبخاصة عن طريق النخاعات والأمعاء (السجق والنقانق).

<u>الكشف عن الفيروسات في الأغذية:</u>

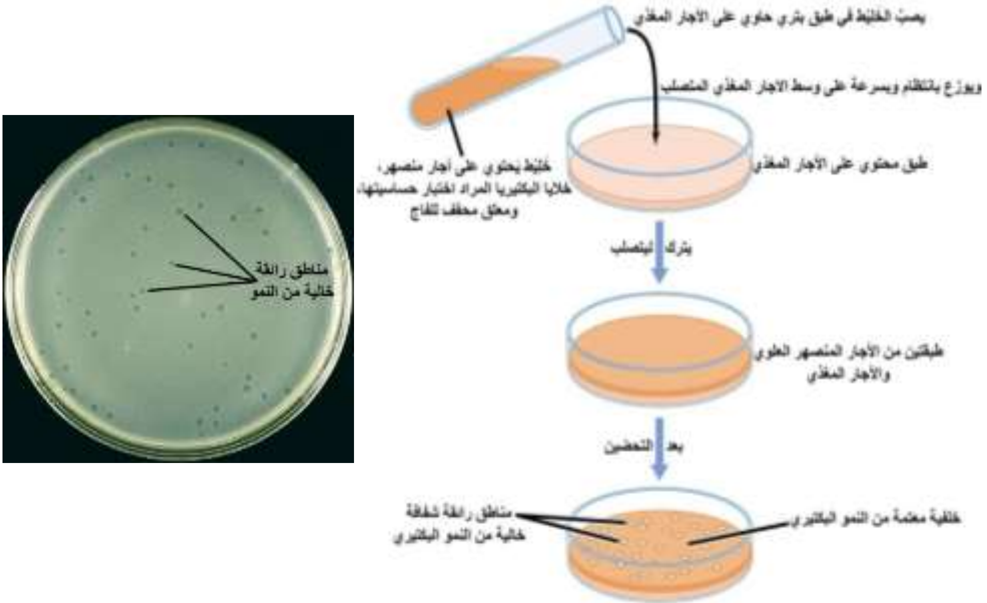
أن الكشف عن الفيروسات في الأغذية يحتاج الى تقنيات متقدمة مثل تقنية تقدير الإدمصاص المناعي بالإنزيم المرتبط **Enzyme Linked Immunosorbent Assay** **(ELISA)**، وتقنيات المسبار (المجس) الجيني **Gene Probes**، والمُقايَسَةٌ المَناعِيَّة **Immunoassay**، والتفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميريز **Polymerase Chain Reaction** **(PCR)**. ويمكننا العودة إلى الطرق المنشورة للكشف عن الفيروسات في الأغذية في عدد من المراجع المتخصصة مثل:

Downes, F.P. and Ito, K. (2001): Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (4th Edition), American public Health Association, Washington, USA.

أو الطريقة المنشورة للكشف عن فيروس التهاب الكبد الفيروسي (أ) **Hepatitis A** في المَحار في الموقع الالكتروني على شبكة الإنترنت الخاص بمركز سلامة الغذاء والتغذية التطبيقية **(Center for Food Safety & Applied Nutrition)**، التابع لإدارة الغذاء والدواء الأمريكية **(U.S. Food & Drug Administration)**، والمنشور بعنوان **Bacteriological Analytical Manual Online**، على العنوان التالي:

http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm

أما طرق الكشف عن لاقمات البكتيريا (البكتيريوفاج) **Bacteriophage** التي تؤثر على بكتيريا البادئات في الأوساط أو البيئات التي يتوقع احتوائها على هذه الفاجات وعزلها لدراستها، فيمكن تلخيصها في الطريقة التالية: حيث تبذر البكتيريا الحساسة في الطور اللوغاريتمي في الآجار المغذي بعد ذلك تخلط معلقات من تخفيفات معلومة لتلك الأوساط أو البيئات التي يتوقع احتوائها على البكتيريوفاج **Bacteriophage** (بعد إجراء عملية الطرد المركزي لهذه الأوساط لإزالة الجزيئات العالقة ثم تمريرها على المرشحات البكتيرية لحجز خلايا الأحياء المجهرية الأخرى والسماح بمرور الفاجات خلالها) مع حجم ثابت من الآجار الطري، كأن يخلط **0.1** مليلتر من معلق الوسط المتوقع احتوائها على الفاج مع 2.5 مليلتر من الآجار الطري المحتوي على البكتيريا المعلوم حساسيتها لهذا الفاج، ويستخدم الآجار (الطري) المحضر بنسبة **0.7 %**، حيث يسمح بانتشار الفاج إلى الخلايا إلى الخلايا المجاورة غير المصابة وفي الوقت نفسه لا يسمح لانتشار الفاجات الجديدة إلى مناطق بعيدة)، ويوزع الخليط (المحتوي على الآجار الطري + معلق الفاج + البكتيريا الحساسة) بانتظام وبسرعة على وسط الآجار المغذي المتصلب من قبل وعقب استقرار هذه الطبقة المغطية تحضن اطباق بتري عند درجة حرارة مناسبة للبكتيريا المختبرة بعدها تظهر مناطق رائقة شفافة خالية من النمو البكتيري **Plaques** على خلفية معتمة من النمو البكتيري. وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الشكل رقم (29) خطوات الكشف عن لاقمات البكتيريا Bacteriophage (يمين)، صورة طبق يوضح تكون مناطق رائقة خالية من النمو على خلفية معتمة من النمو البكتيري (يسار)، عن (Madigan, *et al*. 2012).

ويمكن أن نحسب عدد البكتيريوفاج **Bacteriophage** في البيئة أو الوسط المعزول منها من خلال المعادلة التالية:

عدد مناطق رائقة شفافة خالية من النمو البكتيري **Plaques** × مقلوب التخفيف لمعلق الفاج

ثم يتم عزل الفاج بحاله نقية بواسطة حلقة سلكية ناقلة **Loop** معقمة نلمس بها إحدى المناطق الرائقة الشفافة الخالية من النمو البكتيري **Plaques** ونلقح بها مزرعة بكتيرية سائلة حديثة (عمرها 24 ساعة) من تلك البكتيريا المعلوم حساسيتها لهذا البكتيريوفاج **Bacteriophage**.

البكتيريا Bacteria ذات الأهمية في الأغذية:-

تعتبر البكتيريا من أهم الأحياء المجهرية التي لها علاقة بجودة الأغذية وسلامتها من الناحية الصحية، فهناك أنواع من البكتيريا تسبب فساد وتلف الأغذية، فالنمو البكتيري يجعل المواد الغذائية غير مقبولة من ناحية المنظر كما يحدث فيه تغيرات كيميائية وحسية وبالتالي يكون مرفوضاً كغذاء، وهناك أنواع أُخرى تتسبب في حدوث حالات التسمم الغذائي والعدوى الغذائية Food Poisoning and Food Infection، وهناك أنواع كثيرة أُخرى تستخدم في إنتاج بعض الأغذية مثل الأغذية المتخمرة. فالأغذية المختلفة قد تحتوي على العديد من أنواع البكتيريا، وهذه التشكيلة الواسعة من الأجناس والأنواع البكتيرية التي يمكن أن تحتويها الأغذية قد تكون ضمن الميكروفلورا الطبيعية للأغذية، أو قد تكون ناتجة عن تلوث هذه الأغذية من مصادر مختلفة. ولذلك تحتل دراسة الأنواع البكتيرية المتواجدة في الأغذية أهمية في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية، وكمدخل لذلك لابد من التعرف على وسائل دراسة البكتيريا والتعرف عليها وتسميتها وتصنيفها.

وقد أعد الاتحاد العالمي لعلوم الأحياء المجهرية ضمن مدونة أو دستور عالمي لتسمية وتصنيف البكتيريا International Bacteriological Code of Nomenclature نشر في مجلة البكتيريولوجي عام 1948م [Journal of Bacteriology 1948, 55(3):287]، وهذا القانون يتشابه في بنوده ما يتم في تصنف الكائنات الحية الأخرى حيث أعتمد على أن غاية تصنيف الكائنات الحية هي ضم الكائنات ذات الخواص المتشابهة ضمن مجموعة واحدة بحيث تتميز عن تلك المجاميع الأخرى، وقد جـــــــاءت هذه بكثير من اللوائح والتوصيات التي تشبه كثيراً ما هو مستخدم في تسمية أفراد المملكة النباتية، غير أنها تختلف عنها في بعض التفاصيل.

ومع أن النوع Species هو الوحدة التصنيفية الأساسية في نظامي التصنيف إلا أن تعريفه في الكائنات الراقية يختلف عنه في البكتيريا، ففي الكائنات الراقية قد يعرف النوع Species بوضوح وبصورة دقيقة بأنه مجموعة أفراد من الكائنات الحية ذات صلة Inbreeding group وتوزيع جغرافي محدود مما يودي إلى امتلاك أفراده خواص مظهر خارجي بارزة تميزها عن أفراد أنواع أخرى (أي أنه مجموعة من الأفراد المتشابهة لها خصائص مشتركة في التركيب والوظائف، ويتم التزويج فيها بينها وتنتج أفراداً خصبة تستطيع بدورها التزاوج فيما بينها أيضاً)، وهذه المقاييس التصنيفية لا يمكن تطبيقها على البكتيريا لأن خواص مظهرها الخارجي محدودة، ونادرا ما يكون التكاثر الجنسي فيما بينها إجباريا، حيث يتضح اقتصاره على أجناس قليلة نسبيا،

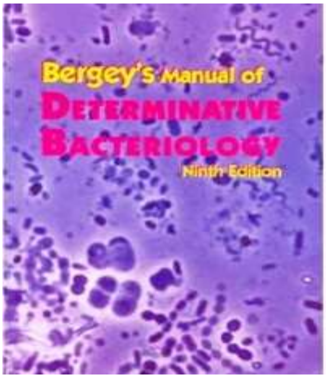
لذا يمكن تعريف النوع **Species** في البكتيريا بدلالة الجماعة الخلوية فقط أو السليلة **Clone** (مجموعة الخلايا التي تنشأ من خلية واحدة) المشتقة بكاملها من خلية مفردة ويتعذر تمييز أفراد السليلة أو الكلون الواحد عن بعضها الآخر لكنها تختلف عادة عن أفراد سليلة لنوع آخر بالعديد من الخصائص وبالتالي فان المشكلة الرئيسة في تصنيف البكتيريا هي محاولة تحديد كم يجب أن يكون الاختلاف بين اثنتين من الكلونات لكي يصنف أفرادهما كنوعين مختلفين، وكلما استنبطت طرق معقدة أكثر فأكثر لفحص البكتيريا كلما توضح الكثير من الاختلافات والتشابهات غير المشكوك فيها. لذلك لكي نتمكن من تعريف البكتيريا ووضعها في مجموعتها التقسيمية الصحيحة يجب أولاً معرفة خواصها، ولأنه من الصعب دراسة خواص خلية بكتيرية فردية واحدة لصغر حجم الخلية المتناهي في الصغر فإننا ندرس خواص البكتيريا في مزرعة نقية (**Axenic Culture** أو **Pure Culture**) وهنا يمكننا التميز بين المصطلحين السابقين حيث أن المصطلح الأول **Axenic Culture** يقصد به المزرعة التي ينمو بها نوع وحيد **Single species** من البكتيريا في بيئة خالية من الكائنات الملوثة ومن المواد الغريبة، ولكنها تحتوى على ملايين الأفراد التابعة للنوع البكتيري المستهدف تنميته بغض النظر عن النقاء الوراثي لهذا النوع البكتيري، أما المصطلح الثاني **Pure Culture** فيقصد به النقاء الوراثي للمزرعة البكتيرية أي أنها سلالة وحيدة نقية وراثياً تنتمي إلى نوع معين وحيد.

تعتمد النظم الخاصة بتصنيف وتقسيم البكتيريا على الأسس التي وضعها عالم البكتيريا الأميركي ديفيد بيرجي **David Bergey** وزملاءه في عشرينيات القرن الماضي، حيث كان أستاذا لعلم البكتيريا في جامعة بنسلفانيا **Pennsylvania** بالولايات المتحدة الأمريكية، وعضو بجمعية البكتيريولوجيين الأميركيين **Society of American Bacteriologists** والتي تسمى حاليا بالجمعية الأميركية لعلم الأحياء المجهرية **American Society for Microbiology**، حيث قام وزملاؤه في الجمعية بتكوين لجنة تحرير لدليل خاص بتصنيف البكتيريا تتكون من ديفيد بيرجي **David Bergey** (رئيساً) وكل من **Francis Harrison** و **Robert Breed** و **Bernard Hammer** و **Frank Huntoon**، ونشرت هذه اللجنة الطبعة الأولى من هذا الدليل في عام **1923**م، ثم صدرت الطبعة الثانية من هذا الدليل في عام **1925**م، فالطبعة الثالثة في عام **1930**م.

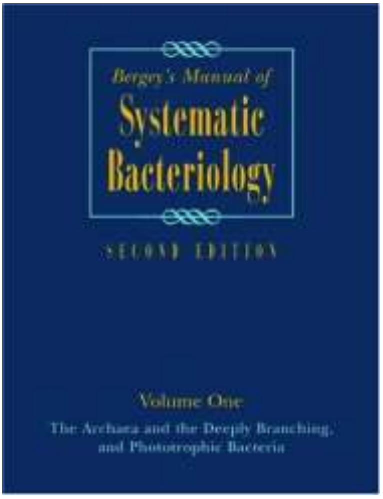
الشكل رقم (30) عالم البكتيريا الأميركي ديفيد بيرجي **David Bergey**.

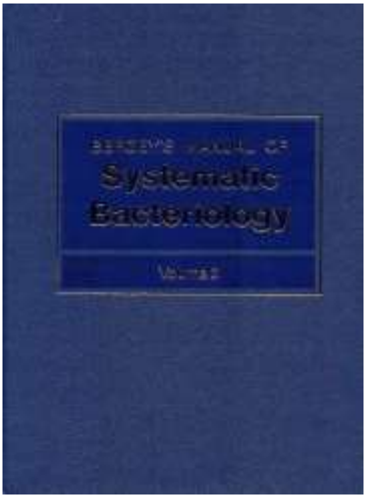
وفي عام 1930م وخلال التحضير للطبعة الرابعة من الدليل طلب الدكتور ديفيد بيرجي من جمعية البكتيريولوجيين الأميركيين حقوق الطبع التي دفعت إلى صندوق الجمعية من بيع الطبعات السابقة لدفع نفقة تهيئة الطبعة الرابعة للنشر، وبالرغم من أن الجمعية وضعت هذا البند في اتفاقها مع الدكتور بيرجي إلا أن ذلك لم يتم نتيجة رفض قيادة الجمعية، وبعد فترة من الصراع تراجعت قيادة الجمعية عن موقفها السابق وقامت بتحويل جميع العائدات من بيع الطبعات السابقة (والمقدرة بحوالي $20,000 عشرون ألف دولار) لصالح الدكتور بيرجي الذي قام بدفع هذا المبلغ لمجلس هيئة أوصياء (غير تجارية - لا تهدف للربح Nonprofit) للإشراف على نشر ذلك الدليل، سميت هذه الهيئة باسم هيئة أوصياء دليل بيرجي Bergey's Manual Trust تخليداً للعمل الذي قام به الدكتور ديفيد بيرجي، ومن ذلك التاريخ قامت هيئة الأوصياء بنشر الطبعة الرابعة وحتى الثامنة خلال الأعوام 1934م، 1939م، 1948م، 1957م، 1974م، على التوالي من هذا الدليل تحت أسم دليل بيرجي لتعريف البكتيريا Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

ثم ظهر المرجع المسمى Bergey's Manual of Systematic Bacteriology بعد أن تحولت الأسس المستخدمة في التقسيم من الأسس الوصفية Descriptive إلى الأسس التصنيفية Systematic حيث نشرت الطبعة الأولى منه بمجلدها الأول في عام 1984م، بعدها نشرت الطبعة التاسعة من دليل بيرجي لتعريف البكتيريا Bergey's Manual of Determinative Bacteriology في عام 1994م، والتي لم تعتمد على العلاقات الوراثية بين أنواع البكتيريا ولكنها وضعت منهجا لتعريف البكتيريا يعتمد على معايير متنوعة مثل تركيب الجدار الخلوي والشكل الظاهري والتصبيغ التفاضلي والاحتياج للأوكسجين والاختبارات الكيموحيوية. إلا أنه لم يمضي وقت طويل حتى ظهرت الطبعة الثانية لدليل بيرجي لتصنيف البكتيريا Bergey's Manual of Systematic Bacteriology والتي اعتمدت على العلاقات الوراثية بين أنواع البكتيريا حيث قامت تصنيف جديد للبكتيريا أكثر وضوح ودقة من غيره من المصادر ونشر المجلد الأول منها في عام 2001م.



الشكل رقم (31) دليل بيرجي لتعريف البكتيريا Bergey's Manual of Determinative Bacteriology، الطبعة التاسعة.





الشكل رقم (32) دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**، الطبعة الأولى (يمين) الطبعة الثانية (يسار).

وفي مجال ميكروبيولوجيا الأغذية حالياً يتم تصنيف البكتيريا بالرجوع إلى دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** بطبعته الثانية، لكن لكي نفهم التطور الذي حدث في مجال تصنيف البكتيريا لابد لنا من التعريج على الطبعة الأولى من هذا الدليل، وقبل ذلك نعرج سريعاً على ما نشر قبلها في الطبعة الثامنة من دليل بيرجي لتعريف البكتيريا **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** في عام 1974م، التي وضعت البكتيريا في مملكة بدائيات النواة **Kingdom Prokaryotae** في تسعة عشر مجموعة مختلفة، وقد اقترح النظام التالي لتقسيم هذه المملكة.

***Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th Edition)**

Kingdom Prokaryotae

Division I- Phototrophic Prokaryotes (Photobacteria)

Class 1. Blue - green algae.
Class 2. Red photobacteria.
Class 3. Green photobacteria.

Division II- Prokaryotes indifferent to Light (Scotobacteria)

Class 1. The bacteria
Class 2. Obligate intracellular scotobacteria in eukaryotic cells (Rickettsia)
Class 3. Scotobacteria without cell wall (Mollicutes).

وقد قسمت مملكة بدائيات النواة Kingdom Prokaryotae إلى قسمين Division هما:

(I) القسم الرئيس الأول Division 1: قِسم بِدائِيَّات النَّواة ضوئية التغذية Phototrophic Prokaryotes (البكتيريا الضوئية Photobacteria) وقد قُسم إلى ثلاثة أصناف هم:

(1) الصنف الأول Class 1: صنف الطحالب الخضراء المزرقة Blue - green algae والتي أصبح اسمها لاحقاً السيانوبكتيريا Cyanobacteria.

(2) الصنف الثانى Class 2: صنف البكتيريا الضوئية الحمراء Red photobacteria.

(3) الصنف الثالث Class 3: صنف البكتيريا الضوئية الخضراء Green photobacteria.

وتشكل البكتيريا التي تنتمي لهذا القسم Division المجموعة الأولى Group 1 من أصل المجاميع التسع عشر التي شملها الدليل، وهي جميع البكتيريا التي تحتوي على أصباغ أرجوانية أو حمراء أو بنفسجية أو خضراء أو بنية، ولها القدرة على القيام بعملية البناء الضوئي.

(II) القسم الرئيس الثانى Division 2: قسم بِدائِيَّات النَّواة غير المعتمدة على الضوء Prokaryotes indifferent to Light وقد قسم هذا القسم أيضاً إلى ثلاثة أصناف هم:

(1) الصنف الأول Class 1: صنف البكتيريا The Bacteria، وتشتمل على ستة عشر مجموعة من أصل المجاميع التسع عشر (من المجموعة 2 وحتى المجموعة 17) وهي:

1- المجموعة الثانية Group 2: البكتيريا المنزلقة Gliding Bacteria.
2- المجموعة الثالثة Group 3: البكتيريا المغلفة Sheathed Bacteria.
3- المجموعة الرابعة Group 4: البكتيريا المتبرعمة أو المذيلة Budding / Appendage.
4- المجموعة الخامسة Group 5: البكتيريا الملتوية Spirochetes.
5- المجموعة السادسة Group 6: البكتيريا الحلزونية والمنحنية Spiral and Curved.
6- المجموعة السابعة Group 7: المكورات والعصيات الهوائية السالبة لتصبغ جرام.
7- المجموعة الثامنة Group 8: العصيات اللاهوائية اختيارياً السالبة لتصبغ جرام.
8- المجموعة التاسعة Group 9: البكتيريا اللاهوائية السالبة لتصبغ جرام.
9- المجموعة العاشرة Group 10: المكورات السالبة لتصبغ جرام.
10- المجموعة الحادية عشرة Group 11: المكورات اللاهوائية السالبة لتصبغ جرام.
11- المجموعة الثانية عشرة Group 12: البكتيريا السالبة لتصبغ جرام كيميائية معدنية التغذية.
12- المجموعة الثالثة عشرة Group 13: البكتيريا المنتجة للميثان.
13- المجموعة الرابعة عشرة Group 14: المكورات الموجبة لتصبغ جرام.
14- المجموعة الخامسة عشرة Group 15: العصيات والمكورات المكونة للأبواغ الداخلية.
15- المجموعة السادسة عشرة Group 16: العصيات الموجبة غير المكونة للأبواغ الداخلية.
16- المجموعة السابعة عشرة Group 17: الأكتينومايسيتات والأحياء القريبة لها.

(2) <u>الصنف الثانى Class 2:</u> صنف البكتيريا غير المعتمدة على الضوء المتطفلة داخل خلوياً (في الخلايا حقيقة النواة) Obligate intracellular scotobacteria in eukaryotic cells، ويشمل المجموعة الثامنة عشر وهي مجموعة الركتسيا Rickettsia. وقد وضعت هذه المجموعة ضمن البكتيريا وليس ضمن الفيروسات (كما كان يعتقد قبل ذلك) على الرغم من أنها طفيليات داخل خلوية إجباراً Obligate intracellular Parasites (فقد كان يعُتقد أنها أقرب إلى الفيروسات بسبب ذلك)، وذلك بسبب انسجام خصائصها مع خصائص البكتيريا وليس مع خصائص الفيروسات حيث أنها تمتاز بما يلي:-

- جسيمها النووي يتركب من الحامضين النوويين DNA ، RNA.
- تتكاثر بالانشطار الثنائي البسيط.
- تحتوي خلاياها على الريبوزمات.
- لا تقاوم العقاقير المضادة للبكتيريا.
- تحتوي خلاياها على نشاط أيضي إنزيمي.
- تنتج ATP كمصدر للطاقة.

في حين لا تتميز الفيروسات بالخصائص السابقة.

<u>(3) الصنف الثالث Class 3:</u> صنف البكتيريا غير المعتمدة على الضوء والتي ليس لها جدار خلوي Scotobacteria without cell wall، وهي الميكوبلازما Mycoplasma التي تشكل المجموعة التاسعة عشر من مجاميع البكتيريا الواردة في هذه الطبعة.

أما الطبعة التاسعة من هذا الدليل Bergey's Manual of Determinative Bacteriology التي صدرت في عام 1994م فيمكن للطالب الإطلاع عليها على شبكة الانترنت على الربط التالي:

http://books.google.com/books?id=jtMLzaa5ONcC&printsec=frontcover&hl=ar#v=onepage&q&f=false

في موقع الكتب الخاص بمحرك البحث الشهير Google (http://books.google.com).

أما الطبعة الأولى من دليل Bergey's Manual of Systematic Bacteriology فقد قدمت تصنيف جديد للبكتيريا أكثر وضوح من الطبعة الثامنة من دليل بيرجي لتعريف البكتيريا Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology الصادرة في عام 1974م، وقد ظهرت الطبعة الأولى من هذا الدليل في أربعة مجلدات (صدر الأول عام 1984م والثاني عام 1986م والثالث والرابع عام 1989م). وتبعاً لهذا التصنيف المتبع في الطبعة الأولى فقد وضعت البكتيريا في مملكة بدائيات النواة Procaryotae وقد قسمت هذه المملكة إلي أربعة أقسام رئيسية، وتنقسم هذه الأقسام الأربعة الرئيسة إلي عدة أقسام فرعية ثم إلي عائلات وأجناس، حيث تم تقسيم البكتيريا إلي (33) مجموعة أو قسم Section، والأربعة الأقسام الرئيسة السابقة الذكر هي:

1- Gracilicutes يشمل بِدائِيَّات النَّواة ذات الجدار الخلوي المميز للبكتيريا سالبة التصبغ بصبغة جرام، Procaryotes with thin cell walls, implying G-ve type cell wall.

2- Firmicutes يشمل بِدائِيَّات النَّواة ذات الجدار الخلوي المميز للبكتيريا موجبة التصبغ بصبغة جرام، Procaryotes with thick & strong skin, implying G+ve type cell wall.

3- Tenericutes يشمل بِدائِيَّات النَّواة التي لا تمتلك جدار خلوي، Procaryotes of a pliable and soft nature, indicating the lack of a rigid cell wall.

4- Mendosicutes يشمل بِدائِيَّات النَّواة التي تظهر بعض الخصائص الوراثية المتقدمة عن القسمين الأول والثاني، (Actinomycetes).

ومن الجدير بالذكر أن البكتيريا المهمة في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية وضعت في القسمين الرئيسين الأول والثاني Gracilicutes and Firmicutes وتقع ضمن المجاميع أو الأقسام الفرعية section التالية (2 ، 4 ، 5 ، 9 ، 12 ، 13 ، 14 ، 15 ، 16)، وسنتعرض هنا (في هذا الملخص) أهم الأجناس والعوائل المهمة في ميكروبيولوجيا الأغذية.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1st Edition)
Kingdom: Procaryotae

I. **<u>Division</u>: Gracilicutes (G-ve Bacteria of medical and commercial importance) (1984).**

1. **Spirochetes**
2. **Aerobic/Microaerophilic, Motile, Helical/Vibrioid Gram-negative Bacteria**
   i. *Genera:* Aquaspirillum, Spirillum, Azospirillum, Oceanospirillum, <u>Campylobacter</u>, Bdellovibrio, Vampirovibrio
3. **Nonmotile (or rarely), Gram-negative Curved Bacteria**
4. **Gram-negative Aerobic Rods and Cocci**
   Family: Pseudomonadaceae

i. Pseudomonas

Family: Azotobacteraceae

Family: Rhizobiaceae

Family: Methylococcaceae

Family: Halobacteriaceae

Family: Acetobacteraceae

ii. Acetobacter

iii. Gluconobacter

Family: Legionellaceae

Family: Neisseriaceae

i. Neisseria

ii. Acinetobacter

iii. *Other Genera:*, Flavobacterium, Alcaligenes, Brucella, Bordetella,

5. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods

Family: Enterobacteriaceae

i. Escherichia

ii. Shigella

iii. Salmonella

iv. Citrobacter

v. Klebsiella

vi. Enterobacter

vii. Erwinia

viii. Serratia

ix. Proteus

x. Yersinia

Family: Vibrionaceae

i. Aeromonas

ii. Vibrio

Family: Pasteurellaceae

i. Pasteurella

6. Anaerobic Gram-negative Straight, Curved, and Helical Rods

Family: Bacteroidaceae

7. Dissimilatory Sulfate or Sulfate-reducing Bacteria

8. Anaerobic Gram-negative Cocci

Family: Veillonellaceae

9. Rickettsias and Chlamydias

Order: Rickettsiaceae

Family: Rickettsiaceae

Tribe: Rickettsieae

i. Rickettsia

ii. Coxiella

10. Mycoplasmas

11. Endosymbionts

II. Division: Firmicutes (G+ve Bacteria of medical and commercial importance) (1986)

12. Gram-positive Cocci

Family: Micrococcaceae

i. Micrococcus
ii. Staphylococcus

Family: Deinococcaceae

i. Deinococcus
ii. *Other Genera:* Streptococcus (Pyogenic Hemolytic Streptococci, Oral Streptococci, Enterococci, Lactic Acid Streptococci, Anaerobic Streptococci), Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Gemella, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Coprococcus, Sarcina

13. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci

i. *Genera:* Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina, Oscillospira

14. Regular, Nonsporing, Gram-positive Rods

i. *Genera:* Lactobacillus, Listeria, Erysipelothrix, Brochothrix, Renibacterium, Kurthia, Caryophanon

15. Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods

i. Corynebacterium
ii. Propionibacterium,
iii. Bifidobacterium

16. Mycobacteria

Family: Mycobacteriaceae

i. Mycobacterium

17. Nocardioforms

III. Division: Tenericutes (1989)

18. Anoxygenic Phototrophic Bacteria
19. Oxygenic Phototrophic Bacteria (Cyanobacteria**)**
20. Aerobic Chemolithotrophic Bacteria and Associated Organisms
21. Budding and/or Appendaged Bacteria
22. Sheathed Bacteria
23. Nonphotosynthetic, Nonfruiting Gliding Bacteria
24. Gliding, Fruiting Bacteria
25. Archaeobacteria (an older term for the Archaea)

IV. Division: Mendosicutes (1989)

26. Nocardioform Actinomycetes
27. Actinomycetes With Multilocar Sporangia
28. Actinoplanetes
29. Streptomyces and Related Genera
30. Maduromycetes
31. Thermomonospora and Related Genera
32. Thermoactinomycetes
33. Other Actinomycete Genera

في حين أن الطبعة الثانية من دليل برجي Bergey's Manual of Systematic Bacteriology من المخطط أن تكون في خمسة مجلدات (حسب ما هو مذكور من قبل الناشر)، وقد صدر المجلد الأول منها في شهر مايو من العام 2001م وهذه المجلدات على النحو التالي:

Volume 1 (2001) *Archaea* and phototrophic *Bacteria* **(ISBN 0-387-98771-1)**

Volume 2 (2005) *Proteobacteria* (in three parts) **(ISBN 0-387-95040-0)**

Volume 3 (2009) the Firmicutes **(ISBN 0-387-95041-9)**

Volume 4 (2011) the *Bacteroidetes, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi and Gemmatimonadetes* **(ISBN 0-387-95043-5)**

Volume 5 (2012) the *Actinobacteria* (in two parts) **(ISBN 0-387-95042-7)**

وقد وضعت هذه الطبعة البكتيريا ضمن مجالين (Domain) رئيسين هما:

1- (Archaea) 2- (Bacteria) ويضم هذين المجالين العديد من الشعب (Phylum) والتي بدورها تنقسم إلى أصناف (Class) ثم إلى رتب (Order) وهذه تشمل العائلات (Family) والتي تضم الأجناس (Genus). وكان هذا التغير الجوهري نتيجة العديد مِنْ التغييراتِ في عِلْم تَصنيف أنواع البكتيريا في العقد الماضي.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2nd Edition)

Domain *Archaea*

Domain *Bacteria*

- **Phylum BIV. "Deinococcus-Thermus"**
  - **Class I. *Deinococci***
    - Order I. *Deinococcales*
      - Family I. *Deinococcaceae*
- **Phylum BV. *Chrysiogenetes***
- **Phylum BVI. *Chloroflexi***
- **Phylum BVII. *Thermomicrobia***
- **Phylum BVIII. *Nitrospira***
- **Phylum BIX. *Deferribacteres***
- **Phylum BX. *Cyanobacteria***
- **Phylum BXI. *Chlorobi***
- **Phylum BXII. *Proteobacteria***
  - **Class I. "Alphaproteobacteria"**
    - Order I. *Rhodospirillales*
      - Family II. *Acetobacteraceae*
        - Genus I. *Acetobacter*
        - Genus VI. *Gluconacetobacter*
        - Genus VII. *Gluconobacter*

Order II. *Rickettsiales*
Family I. *Rickettsiaceae*
Genus I. *Rickettsia*
Order VI. "Rhizobiales"
Family I. *Rhizobiaceae*
Family III. *Brucellaceae*
Genus I. *Brucella*
Class II. "Betaproteobacteria"
Order I. "Burkholderiales"
Family IV. *Alcaligenaceae*
Genus I. *Alcaligenes*
Genus II. *Achromobacter*
Order IV. "Neisseriales"
Family I. *Neisseriaceae*
Genus I. *Neisseria*
Class III. "Gammaproteobacteria"
Order V. "Legionellales"
Family II. "Coxiellaceae"
Genus I. *Coxiella*
Genus II. *Rickettsiella*
Order VIII. *Pseudomonadales*
Family I. *Pseudomonadaceae*
Genus I. *Pseudomonas*
Order X. "Vibrionales"
Family I. *Vibrionaceae*
Genus I. *Vibrio*
Order XI. "Aeromonadales"
Family I. *Aeromonadaceae*
Order XII. "Enterobacteriales"
Family I. *Enterobacteriaceae*
Genus I. *Enterobacter*
Genus X. *Citrobacter*
Genus XII. *Erwinia*
Genus XIII. *Escherichia*
Genus XVI. *Klebsiella*
Genus XXVIII. *Proteus*
Genus XXXII. *Salmonella*
Genus XXXIV. *Shigella*
Genus XL. *Yersinia*
Order XIII. "Pasteurellales"
Family I. *Pasteurellaceae*
Class IV. "Deltaproteobacteria"

Class V. “Epsilonproteobacteria”
Order I. “Campylobacterales”
Family I. *Campylobacteraceae*
Genus I. *Campylobacter*

Phylum BXIII. *Firmicutes*
Class I. “Clostridia”
Order I. *Clostridiales*
Family I. *Clostridiaceae*
Genus I. *Clostridium*
Family III. “Peptostreptococcaceae”
Class II. *Mollicutes*
Class III. “Bacilli”
Order I. *Bacillales*
Family I. *Bacillaceae*
Genus I. *Bacillus*
Family II. *Planococcaceae*
Genus IV. *Sporosarcina*
Family IV. “Listeriaceae”
Genus I. *Listeria*
Family V. “Staphylococcaceae”
Genus I. *Staphylococcus*
Family VI. “Sporolactobacillaceae”
Genus I. *Sporolactobacillus*
Family VII. “Paenibacillaceae”
Order II. “Lactobacillales”
Family I. *Lactobacillaceae*
Genus I. *Lactobacillus*
Genus II. *Pediococcus*
Family IV. “Enterococcaceae”
Genus I. *Enterococcus*
Family V. “Leuconostocaceae”
Genus I. *Leuconostoc*
Family VI. *Streptococcaceae*
Genus I. *Streptococcus*
Genus II. *Lactococcus*

Phylum BXIV. *Actinobacteria*
Class I. *Actinobacteria*
Order I. *Actinomycetales*
Family I. *Actinomycetaceae*
Genus I. *Actinomyces*
Family I. *Micrococcaceae*
Genus I. *Micrococcus*
Family I. *Corynebacteriaceae*
Genus I. *Corynebacterium*

Family IV. *Mycobacteriaceae*
Genus I. *Mycobacterium*
Suborder IX. *Propionibacterineae*
Family I. *Propionibacteriaceae*
Genus I. *Propionibacterium*
Suborder XI. *Streptomycineae*
Family I. *Streptomycetaceae*
Genus I. *Streptomyces*
Order II. *Bifidobacteriales*
Family I. *Bifidobacteriaceae*
Genus I. *Bifidobacterium*
Family II. Unknown Affiliation
Phylum BXV. *Planctomycetes*
Phylum BXVI. *Chlamydiae*
Class I. "Chlamydiae"
Order I. *Chlamydiales*
Family I. *Chlamydiaceae*
Phylum BXVII. *Spirochaetes*
Class I. "Spirochaetes"
Order I. *Spirochaetales*
Family I. *Spirochaetaceae*
Family III. *Leptospiraceae*
Phylum BXVIII. *Fibrobacteres*
Phylum BXIX. *Acidobacteria*
Phylum BXX. *Bacteroidetes*
Class II. "Flavobacteria"
Order I. "Flavobacteriales"
Family I. *Flavobacteriaceae*
Phylum BXXI. *Fusobacteria*
Phylum BXXII. *Verrucomicrobia*
Phylum BXXIII. *Dictyoglomi*

تصنيف البكتيريا Bacterial Taxonomy:

أن نظام التقسيم التصنيفي للبكتيريا هو نظام ملائم مؤلف من أوصاف البكتيريا بدلالة المظهر الخارجي وخواص التصبيغ والخصائص الغذائية والأيضية المميزة وغيرها من المعايير Criteria والطرق المتعددة التي تستخدم لتقسيم البكتيريا والطرق الروتينية للتعرف على بعض أنواعها. وتتلخص الصفات الرئيسة للبكتيريا التي يجب التعرف عليها للمساعدة في تعريف البكتيريا بما يلي:

1- الصفات الظاهرية (المورفولوجية) Morphological Characteristics.

2- الصفات المزرعية Cultural Characteristics.

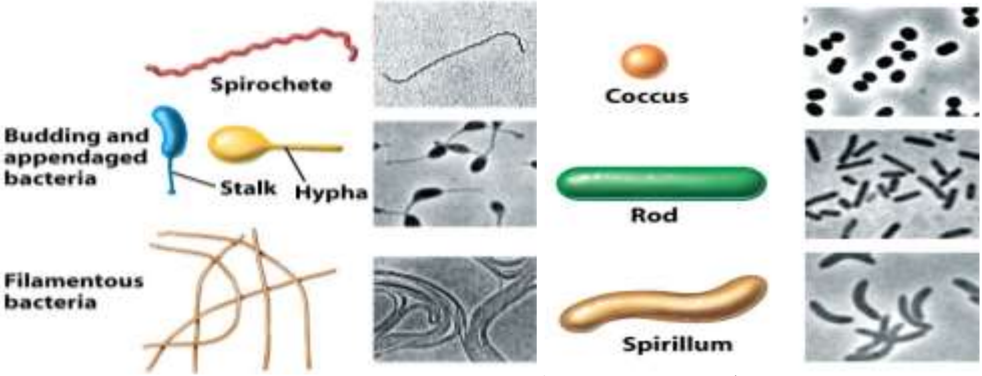
3- الخصائص الايضية Metabolic features ويتم التعرف عليها من خلال الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests.

4- وسائل تصنيفية اخرى مثل الصفات المصلية Serology، الطرز الفاجية Phage Typing، التصنيف الكيميائي Chemotaxonomy (الذي يشمل تحليل وتركيب البروتين وتعاقب الأحماض الأمينية وتركيب اللبيبدات)، دراسة تركيب الجدار الخلوي، الاتجاه الوراثي في التصنيف، والتصنيف العددي Numerical Taxonomy.

<u>الصفات الظاهرية (المورفولوجية) Morphological Characteristics:</u>

يعتمد تقسيم الكائنات الحية الراقية عادة على تفاصيل تركيبها التشريحي، أما في حالة الكائنات الحية الدقيقة فيصعب الاعتماد على هذه الصفة نتيجة لدرجة التشابه الكبيرة بين أنواعها المختلفة خلال الفحص المجهري (حيث تتخذ معظم أنواع البكتيريا الأشكال العصوية والكروية الصغيرة) وبالرغم من ذلك فإن هذه الأنواع تختلف فيما بينها اختلافاً كبيراً في صفاتها الفسيولوجية ونشاطها الأيضي.

وبالرغم من أن الشكل الخارجي للبكتيريا لا يدل كثيرا على علاقات التقارب الوراثي فيما بينها وبين بعضها البعض Phylogenetic relationship، ومع ذلك فإن الصفات المظهرية لا تزال هي الأساس للتعرف على البكتيريا، ومن أهم الصفات الظاهرية Morphological Characteristics المستخدمة في التعرف على البكتيريا شكل الخلية البكتيرية Cell shape، حجم الخلية البكتيرية Cell size، الخصائص التركيبية الدقيقة Ultrastructural characteristics، وجود أو عدم وجود الأسواط flagella، ميكانيكية الحركة Mechanism of motility، شكل وموقع الجراثيم الداخلية (في حال وجودها) Endospore shape and location، وكذلك المحتويات الخلوية Cellular inclusions.



الشكل رقم (33) يوضح أشكال الخلايا البكتيرية Bacterial shape، عن (Madigan, *et al*. 2012).

ويشكل تكوين التجمعات الخلوية للخلايا البكتيرية صفة مهمة يجب الانتباه إليها في عمليات حفظ وتصنيع الأغذية، حيث تتميز بعض أنواع البكتيريا بتكوين تجمعات معينة كأن تكون بشكل سلاسل قصيرة أو طويلة أو على هيئة عناقيد، كما تأخذ بعض البكتيريا أشكال تجمعات أُخرى مختلفة حسب أجناسها المختلفة، وبصورة عامة يصعب قتل جميع البكتيريا في المواد الغذائية إذا كانت في تجمعات أو تكتلات، في حين يسهل قتلها عندما تكون في حالة خلايا مفرده.

ومن الصفات المورفولوجية المهمة للبكتيريا في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية احتواء الخلية البكتيرية على الكبسولة (المحفظة) **Capsules**، حيث يحاط الجدار الخلوي للخلايا البكتيرية أحياناً بغلاف هلامي يعرف بالكبسولة أو المحفظة **Capsules**، ويتكون هذا الغلاف الهلامي من مواد كربوهيدراتية معقدة أو من مواد بروتينية، ووجود هذه الكبسولة يؤدي إلى حماية الخلية البكتيرية من الظروف البيئية القاسية وذلك بزيادة مقاومتها للحرارة والمواد الكيميائية المؤثرة عليها، كما يفيد في جعل الخلايا في مجموعات متماسكة.

ويعزى زيادة لزوجة الغذاء أو تكون مواد ذات طبيعة هلامية لزجة على الأغذية بعد نمو الأنواع البكتيرية المكونة للكبسولة، إلى طبيعة المواد الكيميائية المعقدة المكونة للكبسولة.

كما أن تكوين الجراثيم (الأبواغ) الداخلية **Spores** تعد صفة مهمة وخصوصاً في عمليات حفظ الأغذية بالتعليب، فالبكتيريا من الأجناس العصوية ***Bacillus*** و ***Clostridium*** تشكل جراثيم داخلية (أبواغ) **Endospores**، ولا تكونها البكتيريا العصوية الأُخرى أو البكتيريا الكروية الموجودة في المواد الغذائية. وتختلف الجراثيم الداخلية للأنواع البكتيرية المختلفة في قابليتها على مقاومة الحرارة والظروف الشديدة الأُخرى، وبصورة عامة فان الجراثيم البكتيرية تعد أكثر مقاومة للحرارة والمواد الكيميائية والعوامل المؤثرة الأُخرى من خلايا البكتيريا الخضرية. وتتكون الجراثيم في الخلايا البكتيرية الناضجة في طور النمو اللوغاريتمي المتأخر، حينما تشح العناصر الغذائية في وسط النمو ويزداد تراكم المواد المفرزة من الخلايا البكتيرية، مما يؤثر على بعض المواد الكيميائية داخل الخلية فيؤدى بدوره إلى زيادة الحامض النووي **DNA**، ويحفز بدوره تكوين الجراثيم، كذلك من العوامل المساعدة على تكوينها انخفاض تركيز أيون الهيدروجين **pH** في الوسط، وانخفاض درجة الحرارة عما كانت عليه في حالة النمو، ووجود بعض الايونات المعدنية الخاصة مثل المنجنيز Mn^{++}، وعدم وجود المواد المانعة لتشكل الجراثيم كالأحماض الدهنية، ومما يشجع أيضاً على تكون الجراثيم وجود فائض من المصادر الكربونية والنيتروجينية. وأثناء عملية تشكل الجراثيم يتحول البروتين الخلوي إلى بروتين جرثومي، وتتكون نتيجة ذلك

بعض المركبات المعقدة مثل حامض الدايبيكولينيك Dipicolinic acid و الجلوكوز أمين Glucosamine و حامض الميوراميك Muramic acid. و بصورة عامة فإن عملية إنبات الجراثيم البكتيرية تشجعها الظروف الملائمة لنمو الخلايا الخضرية البكتيرية، ولكن قد تحدث عملية إنبات الجراثيم أحياناً في ظروف لا تسمح بنمو الخلايا الخضرية كانخفاض درجة الحرارة، ويشجع عملية إنبات الجراثيم وجود المزيد من بعض الأحماض الأمينية كالألنين Alanine والسيستين Cysteine والفالين Valine، وبوجود بعض الايونات الثنائية مثل Ca^{++} و Mg^{++} و Mn^{++} و حامض الدايبيكولينيك Dipicolinic acid، والجلوكوز، وكذلك بواسطة صدمة حرارية أو تنشيط حراري يحفز الإنزيمات الكامنة، تتوقف درجة الحرارة المثالية الضرورية والفترة الزمنية المثلى للصدمة الحرارية أو التنشيط الحراري على نوعية هذه الجراثيم، فمثلاً تكون المعاملة الحرارية أشد في حالة جراثيم البكتيريا المحبة للحرارة العالية عن ما هي عليه في حالة جراثيم البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة. وتوقف عملية إنبات الجراثيم باستعمال حمض السوربيك، وبعض الأحماض الدهنية كحامض الاوليك واللينوليك.

وقد تبقى الجراثيم (الأبواغ) البكتيرية في بعض الحالات في حالة سبات (كمون) حتى لو سنحت الظروف الملائمة لنموها، ويطلق على هذه الحالة السكون (Dormancy)، ويرجع عدم إنبات الجراثيم في هذه الحالات إلى فقد مركبات ضرورية كالأحماض الأمينية.

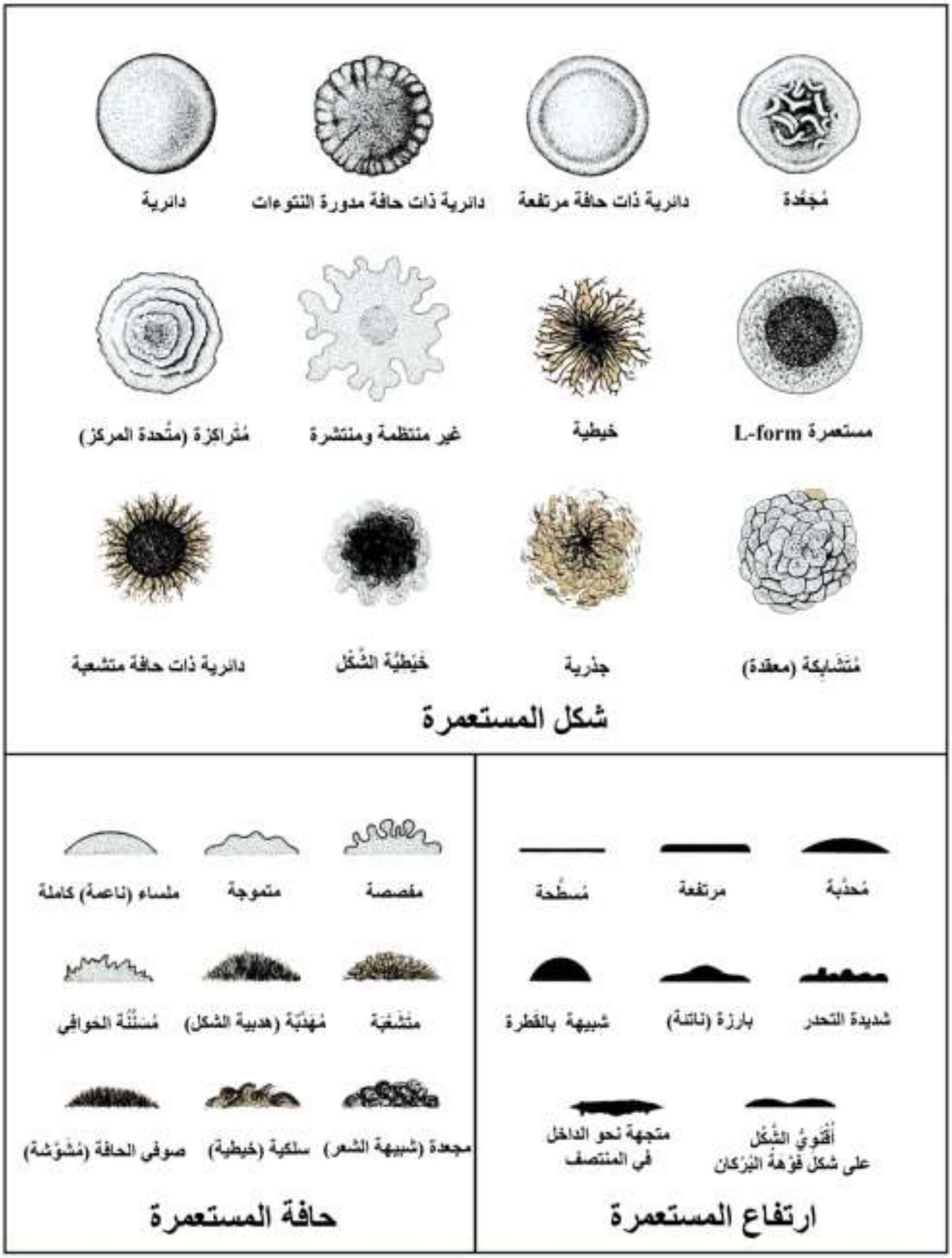
<u>التصبيغ التفاضلي Differential Staining:</u>

تستخدم الأصباغ التفاضلية كأحد الخطوات الأولى في التعرف على نوع البكتيريا. فمعظم أنواع البكتيريا إما أن تكون موجبة أو سالبة لصبغ جرام Gram stain، أما الأصباغ التفاضلية الأخرى مثل صبغ الجراثيم Spore stain والصبغة المقاومة للحمض Acid-fast stain فيمكن استخدامها مع مجموعات محدودة جدا من البكتيريا. ولما كانت آلية هذه الأصباغ تعمد أساسا على تركيب الجدر الخلوية للبكتيريا فهي بالتالي فإنها لا تستخدم للتعرف على أنواع البكتيريا غير المحاطة بجدار أو الأركيوباكتيريا التي تحاط أنواعها بجدر شاذة التركيب.

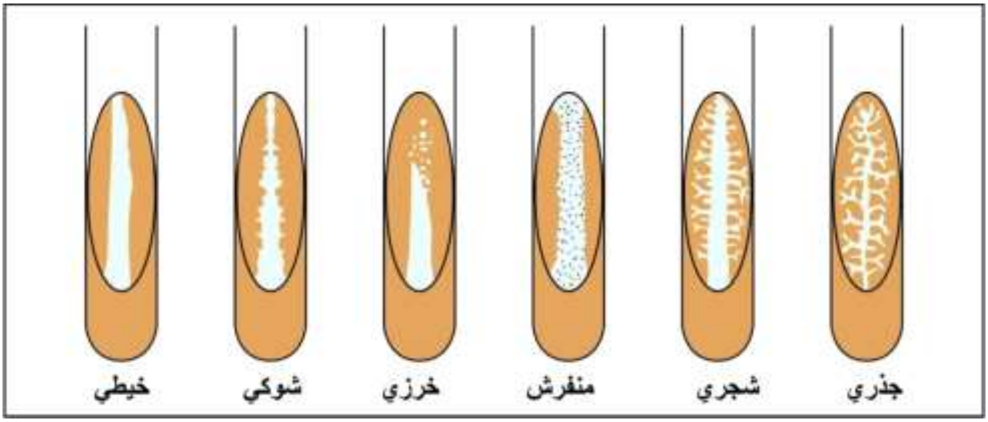
<u>الصفات المزرعية Cultural Characteristics:</u>

من أهم الصفات المزرعية المستخدمة في الخطوات المبكرة في التعرف على نوع البكتيريا وذلك من خلال وصف مظهر المستعمرة Colonial morphology على البيئات الصلبة في الأطباق (من حيث شكل المستعمرة وارتفاعها وشكل حوافها.....الخ)، ومن الصفات المزرعية ايضاً طبيعة النمو على الآجار المائل، ووصف طبيعة النمو على البيئات السائلة، طبيعة النمو على

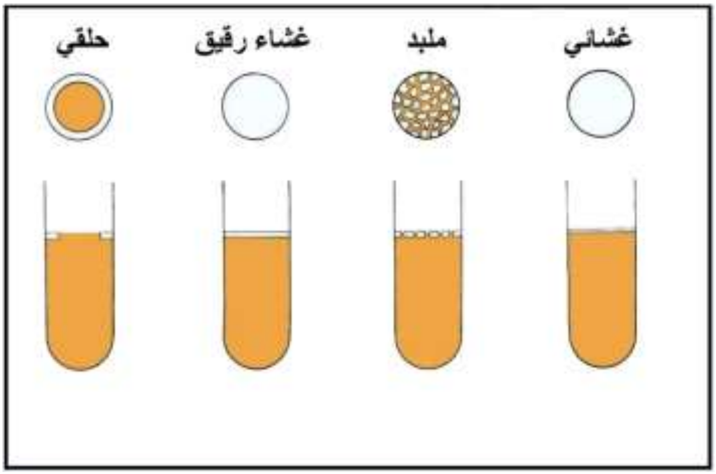
الجلاتين وتحليل البكتيريا لـه مـن عدمـه، كـذلك قدرة البكتيريـا علـى الانتشـار والحركـة عن طريق الوخز في البيئات شبه الصلبة، وكذلك تأثير الظروف البيئية على نمو البكتيريا مثل علاقة البكتيريا بالأكسجين بطريقة المزرعة المهتزة، ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني **pH** الملائمين للنمو.



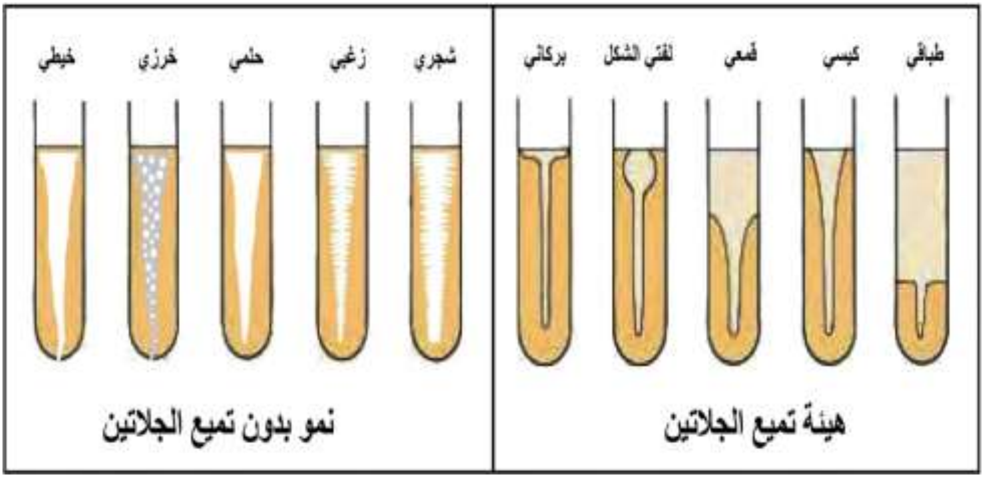
الشكل رقم (34) يوضح مظهر المستعمرة البكتيرية **Colonial morphology**، عن **(Benson, 2001)**.



الشكل رقم (35) يوضح طبيعة النمو البكتيري على الآجار المائل Agar slant، عن (Benson, 2001).

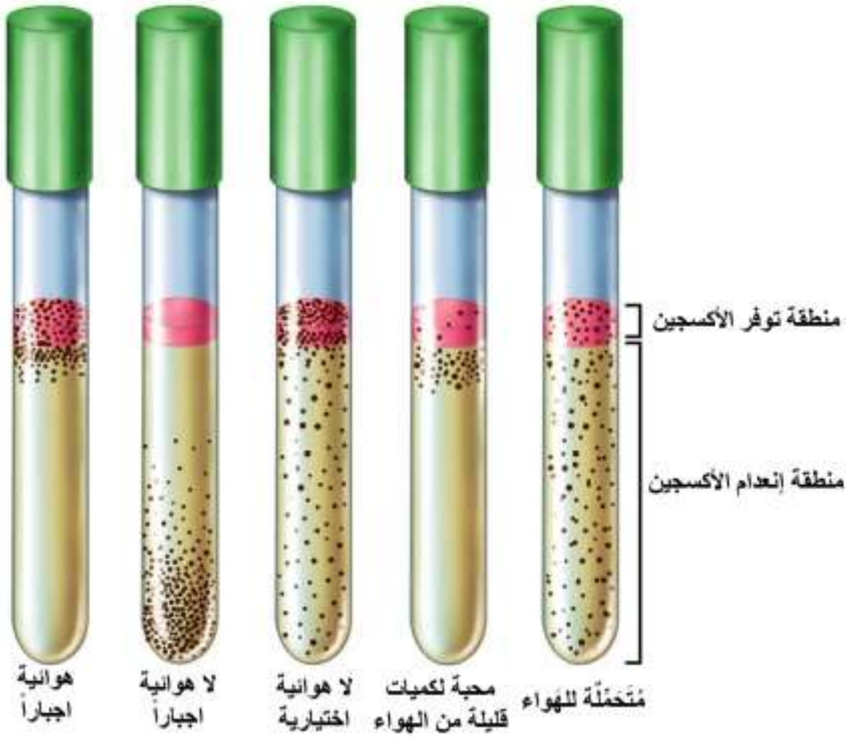


الشكل رقم (36) يوضح طبيعة النمو على البيئات السائلة، عن (Benson, 2001).



الشكل رقم (37) يوضح طبيعة نمو البكتيريا على بيئة الجلاتين، عن (Benson, 2001).

الشكل رقم (38) يوضح قدرة البكتيريا على الانتشار والحركة عن طريق الوخز في البيئات شبه الصلبة، بكتيريا غير متحركة Non-motile (يمين)، ومتحركة Motile (يسار)، عن (Leboffe and Pierce, 2011).



الشكل رقم (39) علاقة البكتيريا بالأكسجين بطريقة المزرعة المهتزة، عن (Madigan, *et al*. 2012).

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests:

تستخدم الأنشطة الإنزيمية بدرجة كبيرة للتمييز بين أنواع البكتيريا شديدة التقارب، ومن أولى الاختبارات الكيموحيوية التي نجريها وهي بداية لما انتهينا به من دراسة الصفات المزرعية لمعرفة علاقة البكتيريا بالأكسجين ولكن ليس عن طريق الوخز في البيئات شبه الصلبة أو بطريقة المزرعة المهتزة ولكن عن طريق معرفتنا لامتلاكها للإنزيمات اللازمة لعملية التنفس من عدمها ومن الإنزيمات المهمة في هذا المجال إنزيمي الكاتليز **Catalase** والأكسيديز **Oxidase**.

- **إنزيم الكاتليز Catalase:**

من معرفتنا لعلاقة البكتيريا بالأكسجين اتضح لنا أنه يمكن تقسيم البكتيريا إلى خمس مجموعات تبعاً لاحتياجها للأوكسجين، وهي بكتيريا هوائية اجباراً **Obligate Aerobes**، ولاهوائية اجباراً **Obligate Anaerobes** ولاهوائية الاختيارية **Facultative Anaerobes**، ومحبة لكميات قليلة من الهواء **Microaerophiles** وأخيراً تلك المتحملة للهواء **Aerotolerant**.

إن عمليات التمثيل الحيوي في وجود الأوكسجين تُنتج جذر حر **Radical** لمركب فَوقَ الأكسيد **Superoxide** الذي يعد مركب سام لجميع الخلايا البكتيرية دون استثناء، ولهذا فإن البكتيريا اللاهوائية إجباراً **Obligate Anaerobes** لا تتمكن من النمو في وجود الأوكسجين، أما البكتيريا الهوائية إجباراً **Obligate Aerobes** التي يعتبر الأوكسجين من العناصر الضرورية لنموها وكذلك اللاهوائية الاختيارية **Facultative Anaerobes** التي تستطيع النمو في وجود أو غياب الأوكسجين، وكذلك الحال للبكتيريا المحبة لكميات قليلة من الهواء **Microaerophiles**، فجميعها تمتلك إنزيم **Superoxide dismutase** الذي يؤدي إلى التخلص من سمية مركب فَوقَ الأكسيد **Superoxide** باختزاله إلى مركب فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 وفقاً للألية التالية:

Superoxide Radical

$$2O_2^{\cdot -} + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Superoxide dismutase}} 2\,H_2O_2 + O_2$$

وعلى الرغم من أن مركب فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 هو أيضاً مركب للنظام الإنزيمي في الخلايا البكتيرية، لكن الأنواع البكتيرية التي تحتاج إلى الأوكسجين تفرز إنزيم الكاتليز **Catalase** الذي يعمل على تكسير مركب فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 السام إلى ماء وغاز الأكسجين، حسب المعادلة التالية:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\,H_2O + O_2\uparrow$$

ونتيجة لافتقار البكتيريا اللاهوائية إجباراً لإنزيمي **Superoxide dismutase** والكاتليز **Catalase** فهي تموت في وجود الأوكسجين، أما البكتيريا المتحملة للهواء **Aerotolerant** فهي تمتلك فقط إنزيم **Superoxide dismutase** ولكنها لا تمتلك إنزيم الكاتليز **Catalase**، ويؤدي تراكم فوق أكسيد الهيدروجين إلى تثبيط نموها بدون أن يتسبب موتها.

ويعتبر اختبار إنزيم الكاتليز **Catalase** من الاختبارات المستخدمة في تصنيف البكتيريا، ويمكن الكشف عن قدرة البكتيريا على إفراز إنزيم الكاتليز بإضافة مركب فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 إلى النمو البكتيري سواء في طبق النمو أو في أنبوبة الاختبار أو على الشريحة حيث يعمل إنزيم الكاتليز عل تحرير غاز الأكسجين من فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 ويتميز ذلك بظهور فقاعات بعد أضافته، كما هو موضح في الشكل التالي.

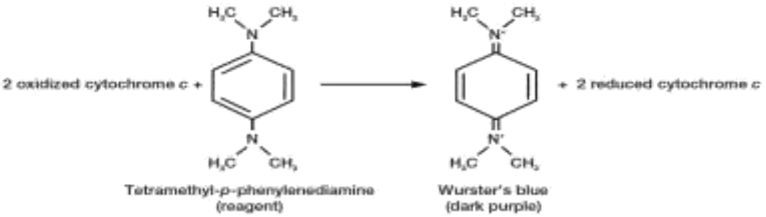
الشكل رقم (40) الكشف عن قدرة البكتيريا على إفراز إنزيم الكاتليز (على الشريحة، في الأنبوبة، في الطبق).

- **إنزيم الأكسيديز Oxidase:**

تؤدي إنزيماتُ الأكسيديز **Oxidase** دور مهم في عملية نظامِ نقلِ الإلكترون أثناء التنفس الهوائية، إنزيم **Cytochrome Oxidase** يستخدم الأكسجين كمستقبل للإلكترونات خلال أكسدة واختزل السيتوكروم سي **Cytochrome C** مكوناً الماء والسيتوكروم سي في حالته المؤكسدة، وفقاً للمعادلة التالية:

$$\text{2 reduced cytochrome c} + 2H^+ + \tfrac{1}{2}O_2 \xrightarrow[\text{Oxidase}]{\text{Cytochrome}} \text{2 oxidized cytochrome c} + H_2O$$

فوجود إنزيم **Cytochrome Oxidase** في البكتيريا يؤكسد **Cytochrome C** الذي يعمل على أكسدة الدليل **(Tetramethyl-p-Phenylenediamine Dihydrochloride)** الذي يضاف قطرات منه على ورق ترشيح مما يعطي لون ارجواني عند أكسدته، كما يتضح هنا:



وعـادة يوضـع دليـل **Tetramethyl-p-Phenylenediamine** علـى ورق ترشـيح أو على شرائط محضرة جافة فهي أكثر ثباتاً من المحلول المائي للدليل.

الشكل رقم (41) الكشف عن إنزيم **Oxidase** على ورق ترشيح وشرائط محضرة (النتيجة + لون ارجواني).

- **إنزيم الكواجيوليز Coagulase:**

إنـزيم الكواجيـوليز مـن الإنزيمـات التـي تخثّـر بلازمـا الـدم بأليـات مشـابهة لحـدوث الجلطـة الطبيعية، ويستفاد من هذا الاختبـار عنـد الكشف عن بكتيريا ***Staphylococcus aureus*** التـي تفرز هذا الإنزيم وتسمى **Coagulase-producing staphylococci**.

الشكل رقم (42) يوضح الكشف عن إفراز إنزيم الكواجيوليز **Coagulase**.

- **إنزيم اليوريز Urease:**

بَعْض البكتيريا قادرة على إنْتاج إنزيمَ يدعى إنزيم **Urease** الـذي يُهـاجمُ رابطـةَ النتـروجين والكربون في مركبات الأميد **amide compounds** مثل اليوريـا مكونـاً نـواتج نهائيـة الأمونيـا، CO_2 والماء، وفقاً للمعادلة التالية:

$$(H_2N)_2C{=}O + 2H_2O \xrightarrow{\text{urease}} CO_2 + H_2O + 2NH_3$$

عند نمو البكتيريا القادرة على إفراز إنـزيم **Urease** فـي وسـط يَحتـوي علـى اليوريـا، فـإن تراكم الأمّونيا في الوسط يَجْعلُه قلوي، مما يـؤدي إلـى ارتفـاع الــ **pH**، وهـذا الارتفـاع فـي الــ **pH** يغير لون الدليل المضاف (الفينول الأحمر **phenol red**) مِن اللون البرتقالي الأحمر إلـى الـوردي الغامق أَو الأحمر الإرجواني (الأحمر الكرزي) فتعتبر نتيجة الاختبار إيجابية لتحلل اليوريا أما في حالة عدم تغير اللون فتكون النتيجة سلبية.

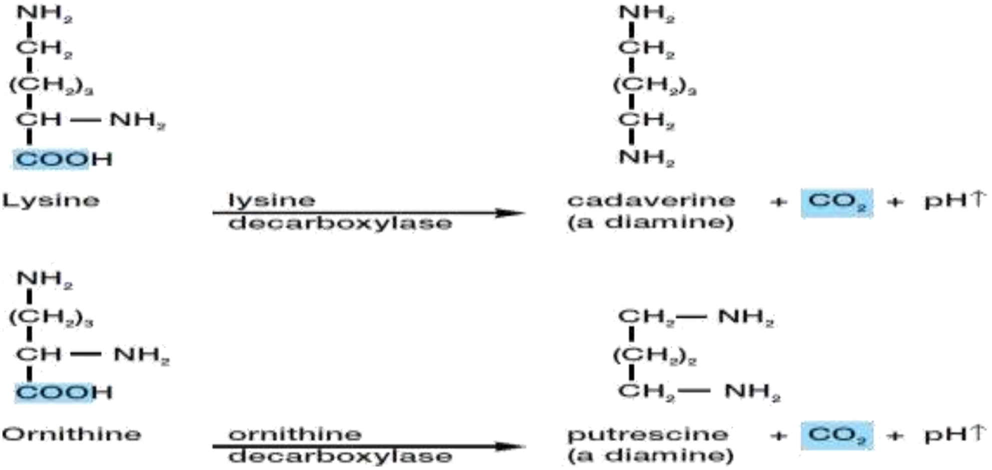
الشكل رقم (43) يوضح الكشف عن إنزيم **Urease**، عن **(Prescott, 2002)**.

- **إنزيمات نزع الكربوكسيل Lysine and Ornithine Decarboxylase:**

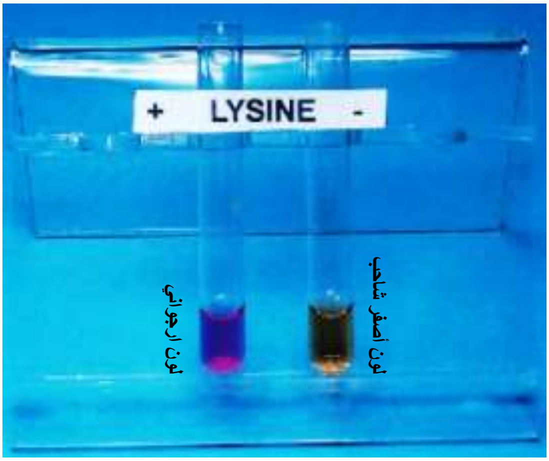
تعمل إنزيمات نزع الكربوكسيل من الأحماض الأمينية على تحويلها إلى صورة الأمين الأولي وفقاً للمعادلة التالية:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \xrightarrow{\text{decarboxylase}} R-CH_2-NH_2 + CO_2$$

ويقوم إنزيم Decarboxylase Lysine بتحويل اللايسين إلى الأمين الأولي Cadaverine، كما يقوم إنزيم Ornithine Decarboxylase بتحويل الأورنيثين إلى الأمين الأولي Putrescine، وفقاً للمعادلات التالية:



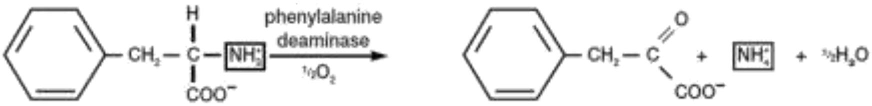
إن إنتاج الأمين الأولي من هذه الأحماض الأمينية يتسبب برفع الرقم الهيدروجيني pH، مما يغير لون الدليل من أصفر إلى أحمر.



الشكل رقم (44) الكشف عن إفراز إنزيم Lysine Decarboxylase، عن (Prescott, 2002).

- **إنزيم نزع الأمين من الفينيل الأنين Phenylalanine Deaminase:**

يَكتشفُ هذا الاختبار تكون حامض الفينيل بيروفيك Phenylpyruvic acid من حـامض الفينيل الأنين منزوع الأمين وفقاً للمعادلة التالية:



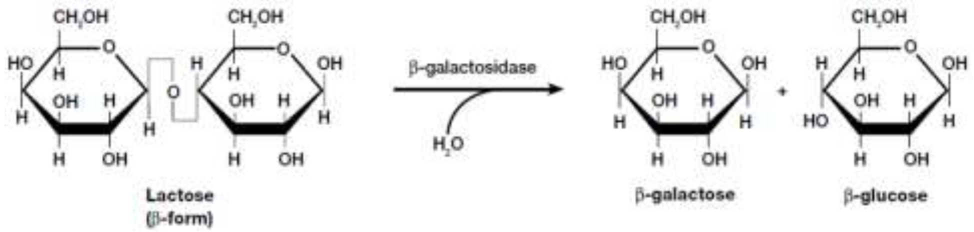
حامض الفينيل بيروفيك المتكون يتفاعل مع ملح كلوريد الحديديك في الوسطِ لإنتـاج لـون يتراوح بين اللون الأسود المميز إلى اللونِ الرماديِ المدخن (أخضر معقد)، وفقاً للمعادلة التالية:

Phenylpyruvic acid + ferric chloride ($FeCI_3$) ⟶ green complex

الشكل رقم (45) يوضح الكشف عن إفراز إنزيم Phenylalanine Deaminase، عن (Prescott, 2002).

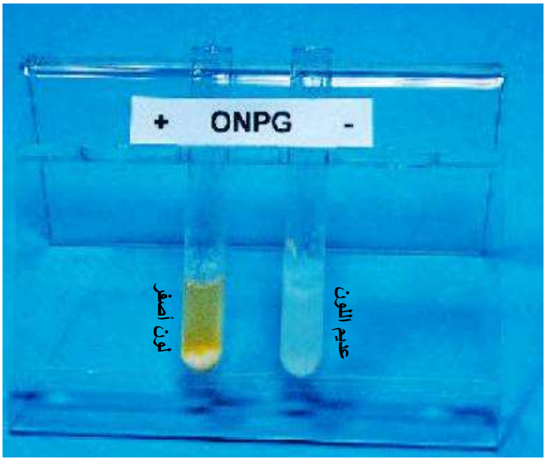
- **اختبار ONPG (إنزيم اللاكتيز β-Galactosidase):**

يعمل إنزيم اللاكتيز أو ما يعرف باسم β-Galactosidase على تحليل سكر اللاكتوز الثنائي إلى مكوناته من السكريات الأحادية الجلوكوز والجالاكتوز وفقاً للمعادلة التالية:



وتستطيع الأحياء المجهرية التي تمتلك إنزيم β-Galactosidase أن تستخدم سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون والطاقة وبالتالي يمكن الكشف عن ذلك من خلال تخمر سكر اللاكتوز كما سبق الإشارة إلى ذلك أعلاه في موضوع تخمر الكربوهيدرات.

وبدلاً عن سكر اللاكتوز الذي يعتبر المادة الخاضعة لعمل الإنزيم يمكن استخدام مواد خاضعة أخرى مثل مركب ONPG (Ortho-nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside) والذي يرتبط فيه مركب Ortho-nitrophenyl مع سكر الجالاكتوز برابطة جلاكتوسيدية من نوع β وهي ذات الرابطة التي يستهدفها إنزيم β-Galactosidase. ينتج عن التحلل المائي لمركب ONPG بواسطة إنزيم β-D-Galactosidase مركب O-nitrophenol الأصفر اللون، ويستخدم عادة كدليل مركب Isopropylthiogalactopyranoside (IPTG).



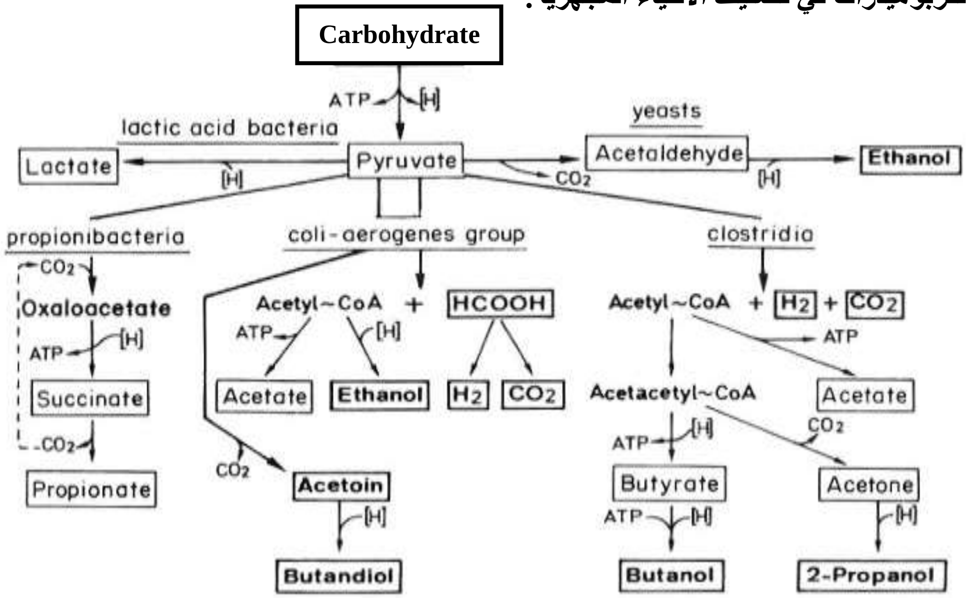
الشكل رقم (46) يوضح اختبار ONPG، عن (Prescott, 2002).

- **تفاعلات التحلل المائي لبعض المركبات Hydrolytic Reactions:**

تعتمد قدرة البكتيريا على التحلل المائي لبعض المركبات مثل (النشا والكازين والجلاتين والليبيدات) على امتلاكها للإنزيمات المحللة لهذه المركبات (إحداها، بعضها أو جميعها) وهي خواص مهمة في تعريف البكتيريا، فمثلاً قدرة البكتيريا على تحليل النشا تكون نتيجة قدرتها على إفراز إنزيم الإميليز Amylase، ويتم الكشف عن تحلل النشا عن طريق إضافة اليود فتتكون هالة رائقة حول مستعمرة البكتيرية المحللة للنشا. كما تمتلك بعض أنواع البكتيريا القدرة على تحليل أنواع معينة من البروتينات مثل الكازين والجلاتين وكذلك الليبيدات، حيث تمتلك بعض الإنزيمات المحللة للبروتينات و / أو الليبيدات، ويستفاد من هذه الخواص في تعريف البكتيريا.

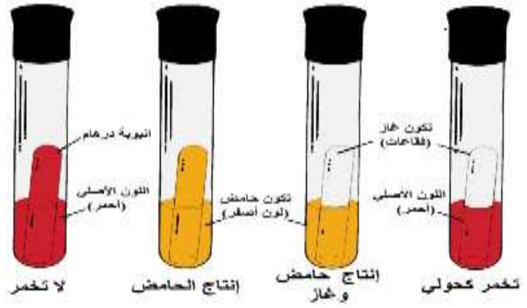
- **تخمر الكربوهيدرات Carbohydrates Fermentation:**

تستطيع بعض الأحياء المجهرية أن تمثل مدى واسع من المواد الكربوهيدراتية بينما البعض الآخر يخمر عدداً قليلا منها. وتختلف الأحياء المجهرية أيضاً في الطريقة التي يتم بها تحليل نوع ما من الكربوهيدرات، كما تختلف النواتج النهائية المتكونة فبعضها يكون الأحماض العضوية (حامض اللاكتيك، حامض الخليك، حامض البيوتريك، حامض البروبيونيك)، وبعضها يكون نواتج متعادلة (أسيتون، الكحول البيوتيلي، الكحول الإيثيلي)، وقد تتكون عدد من الغازات (هيدروجين، ثاني أكسيد الكربون، الميثان)، وعلى ذلك يمكن الاستفادة من نواتج تمثيل الكربوهيدرات في تصنيف الأحياء المجهرية.



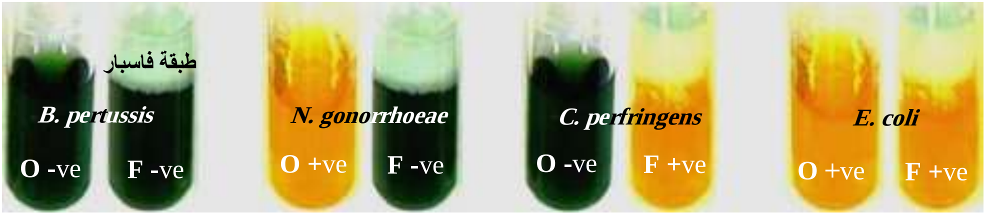
الشكل رقم (47) نواتج أيض الكربوهيدرات والتي تختلف باختلاف الكائن المجهري، عن (Schlegel, 1993).

وتعتبر الأحماض العضوية من بين النواتج المعروفة لتحلل الكربوهيدرات، كما قد تتكون نتيجة تخمر الكربوهيدرات أيضاً غازات مثل ثاني أكسيد الكربون أو/ و الهيدروجين، ويعتمد نوع المركبات الناتجة ونسبتها إلى بعضها على نوع البكتيريا ونوع المادة الكربوهيدراتية المتحللة، وبناء على ذلك فإن قدرة البكتيريا على تحليل سكر معين أو مجموعة سكريات أو مواد كربوهيدراتية أخرى تضاف للبيئة تمدنا بمعلومات مهمة في تقسيم أنواع البكتيريا المختلفة، والسهولة التي يمكننا بها معرفة تكون الحامض والغاز من مختلف الكربوهيدرات لها أهمية تطبيقية كبيرة، حيث يمكن بسهولة التأكد من تكون الأحماض بإضافة دليل حساس للتغير في الرقم الهيدروجيني في بيئة النمو، أما تكون الغاز في البيئة السائلة فيمكن معرفته بوضع طبقة من الفاسبار فوق البيئة، أو بوضع أنبوبة صغيرة تدعى أنبوبة درهام **Durham tube** مقلوبة داخل تلك البيئة السائلة، أما تكون الغاز في البيئات الصلبة فإنه يكون مصحوباً بتكون فقاعات غازية تحدث تشققا في طبقة الآجار.



الشكل رقم (48) يوضح اختبار تخمر الكربوهيدرات، عن (Prescott, 2002).

وقد لا تقوم بعض البكتيريا بتخمير الكربوهيدرات ولكنها تمثلها بالأكسدة، وفي مثل هذه البكتيريا فإن تكون الحامض أثناء تحلل الكربوهيدرات يتم فقط تحت الظروف الهوائية. وعند نمو هذه البكتيريا في أنابيب الآجار فإن الحامض يتكون فقط على سطح الآجار، ولا يتكون بتاتا إذا قمنا بتغطية الآجار بطبقة من زيت معدني أو بالفاسبار. أما إذا تكون حامض في مزرعة نامية في أنبوبة أجار مغطاة فإن ذلك يعنى حدوث تخمر، ولتحديد نوع التغير في الكربوهيدرات هل هو تخمر أم تأكسد أهمية كبيرة في تعريف بعض أنواع العصويات السالبة لصبغة جرام.



الشكل رقم (49) يوضح اختبار **Carbohydrates Oxidation/Fermentation reaction**.

- **اختبار أجار الحديد والسُكريات الثلاثة TSI agar:**

يستخدم اختبار أجار الحديد والسُكريات الثلاثة TSI agar عموماً لتعريف البكتيريا المعويّة، وهو أيضاً يُستَعملُ لتَمييز عائلة Enterobacteriaceae عن العصويات المعوية السالبة لتصبيغ جرام الأخرى من حيث قدرتها على هدم الجلوكوز، اللاكتوز، أَو السكروز، وتحرير الكبريتيد مِن كبريتات الأمونيوم الحديدية أو ثايوكبريتات الصوديوم.

وتحتوي بيئة الحديد والسُكريات الثلاثة TSI agar على تركيز 1 % من كلٍ من سكري اللاكتوز والسكروز، و 0.1 % من سكر الجلوكوز، كما يحتوي على دليل الفينول الأحمر كمؤشر للرقم الهيدروجيني في البيئة والكشف عن إنتاج الأحماض العضوية كنواتج لتخمر الكربوهيدرات.

تلقّح أنابيب الآجار المائل لبيئة الحديد والسُكريات الثلاثة TSI agar بوخز عُمق الآجار بإبرة التلقيح مباشرة وبعد ذلك يتم التخطيط على السطح المائل للبيئة على شكل متعرّج، ثم تحضن الأنابيب الملقحة لمدة تتراوح بين 18 إلى 24 ساعة من أجل اكتشاف وجود تخمر للسكر، وإنتاج للغاز وإنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S. وقد تحدث أحد التفاعلات التالية في أنابيب الآجار المائل لبيئة الحديد والسُكريات الثلاثة TSI agar:

1- عُمق الآجار يكون أحمر (K) والسطح المائل يكون أحمر (K): هذا هو لون الانبوبة غير الملقحة بأي بكتيريا، وفي حالة تلقيح الأنبوبة بالبكتيريا المراد اختبارها فتدل هذه النتيجة على أنه لم يحدث أي تخمر لأي من السكريات الثلاثة كما لم يحدث أي تكوّن للغاز أو كبريتيد الهيدروجين في البيئة.

2- عُمق الآجار أصفر (A) والسطح المائل أحمر (K): تدل هذه النتيجة على <u>تخمر سكر الجلوكوز</u> (حيث يتحول لون دليل الفينول الأحمر إلى اللون الأصفر بسبب تكوّن حامض في عُمق الآجار). في حين يَبْقى السطح المائل أحمر (قلوي) (K) حيث أن قلة نسبة الجلوكوزِ في البيئة تجعل البكتيريا تعتمد على عملية Oxidative decarboxylation للأحماض الأمينية في البيئة لإنتاج الطاقة في وجود الأوكسجين قُرْب السطح المائل ينتج عن ذلك تكون وسط قلويُ.

3- عُمق الآجار أصفر (A) والسطح المائل أيضاً أصفر (A): تدل هذه النتيجة على <u>تخمر سكر اللاكتوز و/ أَو السكروز</u> (حيث يتحول لون دليل الفينول الأحمر في كل من عُمق الآجار وسطحه المائل إلى اللون الأصفر بسبب تكوّن كميات كبيرة من حامض في البيئة).

4- ملاحظة تكون غازِ من خلال تشِقق الآجار أو ارتفاعه عن قاع الأنبوبة.

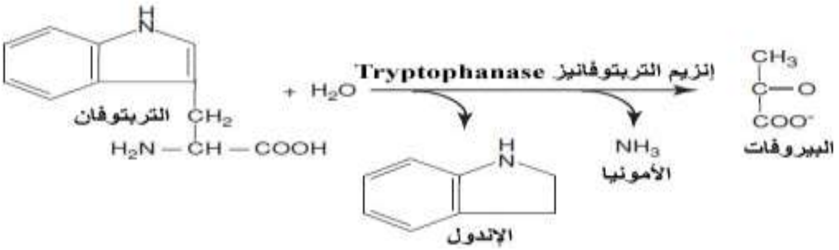
5- ظهور اللون الأسود في البيئة يدل على انتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S.

الشكل رقم (50) يوضح نتائج اختبار أجار الحديد والسُكريات الثلاثة **TSI agar** لبعض البكتيريا المعوية.

- **اختبارات (IMViC) The IMViC Tests:**

تستخدم الاختبارات التي تعرف باسم **IMViC** للتفريق بين أفراد عائلة البكتيريا المعويّة **Enterobacteriaceae**، وخصوصاً ***Escherichia coli*** و ***Enterobacter aerogenes***، واختبارات **IMViC** عبارة عن أربعة اختبارات هي:

1- <u>اختبار تكون الإندول **Indole Formation**</u>: يشار لهذا الاختبار بالحرف **(I)**، ويجرى هذا الاختبار بهدف التعرف على امتلاك بعض انواع من البكتريا لإنزيم التربتوفانيز **Tryptophanase** الذي يعمل على تكسير الحامض الأميني تربتوفان وتكوين الإندول الذي ينتج مِن أيض التربتوفان إضافة إلى كل من البيروفات والأمونيا وفقاً للمعادلة التالية:



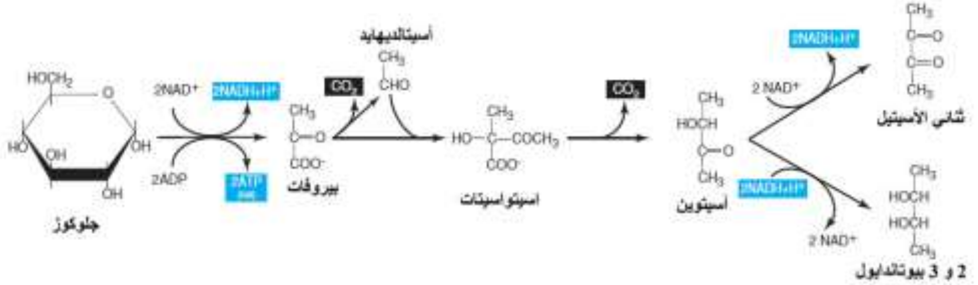
ويتم الكشف عن تكون الإندول بواسطة كاشف كوفاكس **Kovacs' reagent** الذي يتكون من مركب ***p*-Dimethylaminobenzaldehyde** والكحول الأميلي وحامض الهيدروكلوريك المركز، وتتمثل النتيجة الموجبة لهذا الاختبار بانفصال طبقة كحولية فوق الطبقة المائية وظهور حلقة من اللون الوردي **Pink** إلى الأحمر في هذه الطبقة وهي دليل وجود الإندول، وفقاً للمعادلة التالية:

إندول + ***p*-Dimethylaminobenzaldehyde** $\xrightarrow[\text{كحول أميلي}]{\text{HCL حامض}}$ حلقة حمراء فوق الوسط

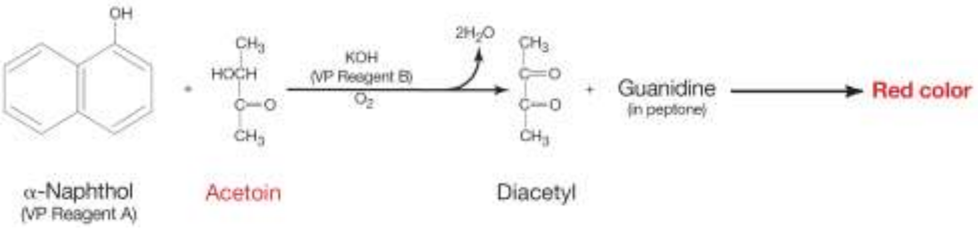
Kovacs' reagent كاشف كوفاكس

2- <u>اختبار أحمر المثيل Methyl Red</u>: يشار له بالحرف (M)، وهذا الاختبار يكشف عن البكتيريا التي لا تحول النواتج الحامضية إلى مركبات متعادلة مثل الإيثانول والبيوتانداديول واستيل المرافق الإنزيمي أ Acetyl-CoA والتي عند إنتاجها ترفع الأس الهيدروجيني إلى حدود pH 6، في حين أنه عند عدم إنتاج هذه المركبات المتعادلة يكون الأس الهيدروجيني في حدود pH 4 مما يعطي نتيجة إيجابية مع هذا الاختبار.

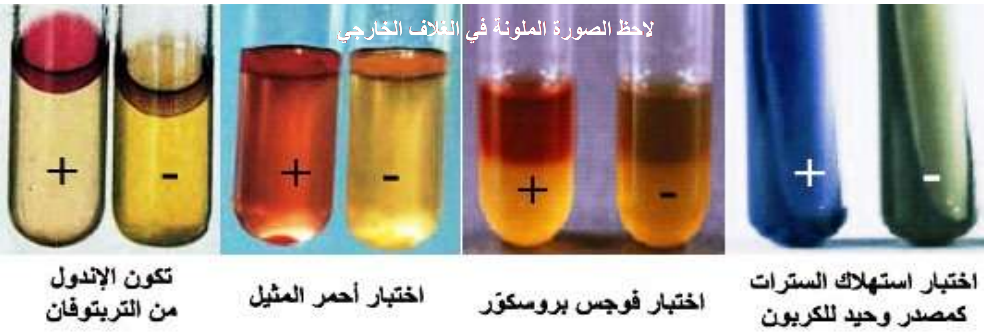
3- <u>اختبار فوجس – بروسكوّر Voges-Proskauer</u>: يشار له بالحرف (V)، وهذا الاختبار يكشف عن إنتاج البكتيريا للأستيل ميثيل كاربينول (الأسيتوين Acetoin) وهو مركب وسطي في عملية إنتاجِ البُوتيلين جليكول Butylene Glycol (3،2 بيوتانداديول) مِنْ تخمر الجلوكوز وفقاً للمعادلة التالية:



وتتمثل النتيجة الموجبة لهذا الاختبار بإنتاج لون احمر (نتيجة تكون الجوانيدين Guanidine وثنائي الأسيتيل من خلال تفاعل أسيتوين Acetoin مع كاشف ألفانفثول α-naphthol الموجود في محيط قاعدي)، وفقاً للمعادلة التالية:



4- <u>اختبار استهلاك السترات Citrate كمصدر وحيد للكربون</u>: يشار له بالحرف (C)، ويستخدم في هذا الأختبار الوسط Simmon's citrate في هذا الفحص وهو يحتوي على السترات (على هيئة سترات صوديوم) كمصدر وحيد للكاربون كما يحتوي على كاشف Bromthymol blue، ويكون لون البيئة اخضر فإذا ما استهلكت البكتيريا السترات فإنها تنتج حامض الأكسالواستات والخلات، وعند تكوين البيروفات من الأكسالواستات يتكون CO_2 فيتحد مع الصوديوم مكوناً كربونات الصوديوم Na_2CO_3 مما يغير طبيعة الوسط نحو القاعدية ومن ثم تغير لون الوسط الى اللون الازرق. أما الحرف (i) في كلمة IMViC يضاف إلى الكلمة لتسهيل نطقها.



الشكل رقم (51) يوضح نتائج الاختبارات المعروفة باسم IMViC، عن (Prescott, 2002).

- **تأثير البكتيريا على بيئة حليب عباد الشمس Litmus Milk:**

تتكون بيئة حليب عباد (دوار) الشمس Litmus Milk من حليب فرز مضاف إليه دليل عباد الشمس بنسبة 0.75 جرام/لتر. وعند تلقيح البكتيريا في أنابيب حاوية على بيئة حليب عباد الشمس Litmus Milk تحدث أحد التفاعلات التالية:

1- التفاعل الحامضي، صبغة عباد الشمس تُصبحُ حمراء أو وردية، (نتيجة مثالية للبكتيريا المخمرة لسكر اللاكتوز).

2- التفاعل القلوي، صبغة عباد الشمس تُصبحُ زرقّاء أَو أرجوانية، (هذه النتيجة تسبّبُها الكثيرُ من البكتيريا المحللة للبرُوتين خلال الـ 24 ساعة الأولى).

3- صبغة عباد الشمس تُصبحُ بيضاء (بسبب اختزال لون الصبغة بفعل البكتيريا المختزلة للوسط).

4- تكون خثرة في البيئة، (يحدث تصلب بسبب تخثرِ بروتينِ، وإمَالَة الأنبوبة بزاوية 45° يُشير إلى حدوث ذلك التخثر من عدمه).

5- هضم وتحلل البروتين Peptonization تُصبح البيئة شبه شفافَة (وفي أغلب الأحيان يتحول لونها إلى لون داكن في هذه المرحلة، وتسببها البكتيريا المحللة للبرُوتين).

6- تكوّن لزوجة سميكة في قاعِ الأنبوبة (يُمْكِنُ ملاحظتها بالحلقةِ السلكية المعقّمةِ loop).

الشكل رقم (52) تأثير بعض البكتيريا على بيئة Litmus Milk، عن (Leboffe and Pierce, 2011).

ويمكن اختصار الزمن اللازم لتعرف البكتيريا إلى درجة كبيرة بواسطة استخدام أوساط غذائية انتقائية وتفاضلية Selective and Differential Media أو باستخدام طرق التعريف السريعة. ويحتوي الوسط الغذائي الانتقائي (الاختياري) على مواد تعمل على تثبيط نمو البكتيريا المنافسة، وتشجع نمو البكتيريا المرغوب فيها، أما الوسط الغذائي التفاضلي (التفريقي) فيسمح إلى حد كبير بنمو البكتيريا المرغوبة لتكون مستعمرات مميزة.

الشكل رقم (53) يوضح وسط أجار الدم كمثال على أحد الأوساط التفريقية الإغنائية.

الشكل رقم (54) يوضح وسط MSA كمثال على أحد الأوساط الاختيارية التفريقية.

كما تم عمل وسائل سريعة لتعريف مجموعات البكتيريا تعرف الأنظمة التجارية لتعريف البكتيريا، وقد تم تصميم هذه الوسائل لتقوم بعمل عدة اختبارات في وقت واحد، ويمكن بواسطتها التعرف على البكتيريا في زمن يتراوح بين 4 – 25 ساعة، وتعطى نتائج الاختبارات أرقاماً (تختلف حسب نوع الوسيلة المستخدمة) تعتمد على درجة أهمية وحقيقة كل اختبار منها، وهذه الأرقام تتحول إلى شفرة عددية تستخدم بعد ذلك لتصنيف العزلة البكتيرية المجهولة بحيث تقارن الشفرة العددية بالنتائج الموجودة في بنك المعلومات الذي يحتوي على سلسلة من التصنيفات تشير إلى الاحتمال الإحصائي الذي يحدد بكتيريا بعينها، وفيما يلي أمثلة على هذه الأنظمة:

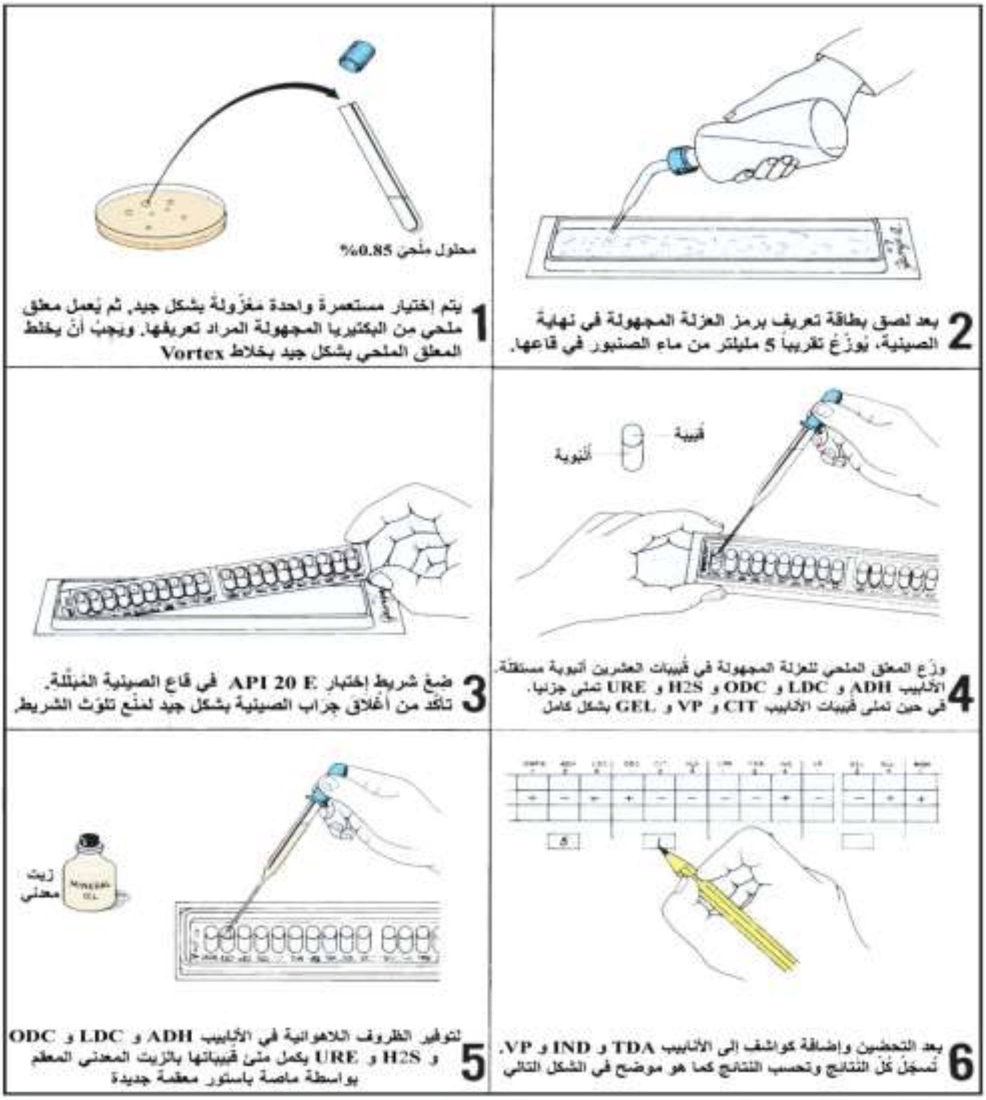
نظام API 20E لتعريف البكتيريا المعوية:

من أهم الأنظمة التجارية لتعريف البكتيريا التي تشكل وسائل سريعة مجموعة أنظمة Analytical Profile Index (API) والذي يمثل نظام API 20A أحد أمثلته المستخدمة في تعريف مجموعة البكتيريا اللاهوائية Anaerobes، نظام API Campy المستخدم في تعريف بكتيريا Campylobacter، نظام API Coryne المستخدم في تعريف بكتيريا Corynebacteria، نظام API 20 NE المستخدم في تعريف البكتيريا العصوية السالبة لتصبيغ جرام، نظام API NH المستخدم في تعريف بكتيريا Neisseria-Haemophilus، نظام API Listeria المستخدم في تعريف بكتيريا Listeria، نظام API Staph المستخدم في تعريف بكتيريا Staphylococci، نظام API Strep المستخدم في تعريف Streptococci، نظام API 50 CH المستخدم في تعريف بكتيريا حامض اللاكتيك، نظام API C AUX المستخدم في تعريف الخمائر، وكذلك أنظمة API 10S و API 20E و RapiD 20E المستخدمة جميعها في تعريف عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae*.

وتوجد أنظمة تعريف أخرى غير مجموعة أنظمة API ومن أبرز أمثلتها نظام Enterotube II الشبيه بنظام API 20E والذي يستخدم كلاهما تعريف عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae*، وسوف يتم استعراض هذين النظامين بشيء من التفصيل حيث أنهما من أكثر الوسائل السريعة المستخدمة في تعريف البكتيريا.

يتضمن نظام API 20E عشرين قسما بلاستيكياً في شريط وتحتوى هذه الأقسام على بيئات جافة مختلفة، ويتم إضافة الماء المعقم إلى كل قسم لإعداد البيئة، وتلقح بمعلق الخلايا المطلوب اختبارها ثم يحضن الشريط كله بوضعه في صينية خاصة تمنع جفافه أثناء التحضين.

الشكل رقم (55) يوضح نظام API 20E، (جميع النتائج سلبية في الأعلى، وجميع النتائج إيجابية في الأسفل).



الشكل رقم (56) يوضح خطوات العمل بنظام API 20E، عن (Benson, 2001).

الشكل رقم (57) يوضح كيفية حساب النتائج الخاصة بنظام API 20E.

جدول رقم (1): يوضح تفسير النتائج الخاصة بنظام API 20E

م	الأنبوبة	فترة التحضين	النتيجة السلبية	النتيجة الإيجابية	الملاحظات
1	ONPG		عديم اللون	أصفر	ينتج عن التحلل المائي لمركب ONPG بواسطة إنزيم β-D-Galactosidase مركب O-nitrophenol الأصفر اللون، ويستخدم عادة كدليل مركب (ITPG) isopropylthiogalactopyranoside.
2	ADH	18 – 24 ساعة 36 – 48 ساعة	أصفر أصفر إلى برتقالي	أحمر إلى برتقالي أحمر	يقوم إنزيم Arginine dihydrolase بتحويل الأرجنين إلى أورنيثين وآمونيا و CO_2 وذلك يتسبب برفع الرقم الهيدروجيني pH، مما يغير لون الدليل من أصفر إلى أحمر
3	LDC	18 – 24 ساعة 36 – 48 ساعة	أصفر أصفر برتقالي	أحمر برتقالي أحمر	يقوم إنزيم Lysine Decarboxylase بتحويل اللايسين إلى الأمين الأولي Cadaverine مسبباً تحول لون الدليل من الأصفر إلى الأحمر نتيجة إرتفاع الرقم الهيدروجيني pH.
4	ODC	18 – 24 ساعة 36 – 48 ساعة	أصفر أصفر أو برتقالي	أحمر أو برتقالي أحمر	يقوم إنزيم Ornithine Decarboxylase بتحويل الأورنيثين إلى الأمين الأولي Putrescine مسبباً تحول لون الدليل من الأصفر إلى الأحمر نتيجة ارتفاع الـ pH.
5	CIT		أخضر لامع أو أصفر	فيروزي Turquoise أو أزرق غامق	استعمال السترات كمصدر وحيد للكربون، يؤدي إلى رفع الرقم الهيدروجيني pH، مما يُغيّرُ لونَ الدليل الموجود في الوسط إلى الأزرق الغامق.
6	H_2S		عدم وجود أي راسب أسود	راسب أسود	ينتج H_2S من تحلل للمركبات المحتوية على الكبريت، ويتفاعل مع أملاحِ الحديد الموجودة في الوسطِ ليكون راسب أسود.
7	URE	18 – 24 ساعة 36 – 48 ساعة	أصفر أصفر أو برتقالي	أحمر أو برتقالي أحمر	تتحلل اليوريا بإنزيم Urease مما يؤدي إلى إنْتاج الأمّونيا التي ترفع الرقم الهيدروجيني pH وتغير لون الوسط مِنْ الأصفرِ إلى الأحمر.
8	TDA		أضف قطرة من 10% كلوريد الحديديك أصفر	 أحمر بُني	ينتج إندول بيروفيت Indolepyruvic acid مِن التربتوفان في وجود Tryptophan deaminase وذلك المركب يكون لون أحمر بُني في وجود كلوريد الحديديك.

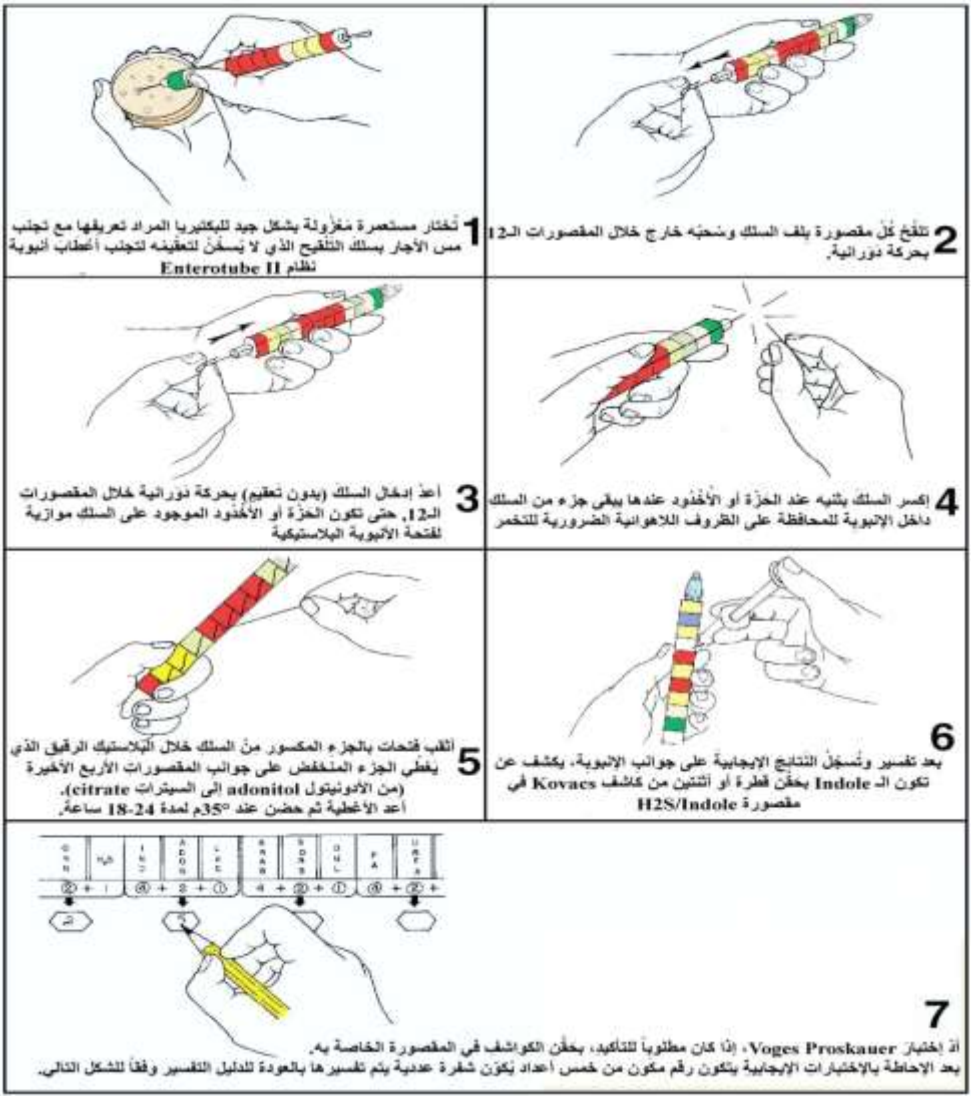
9	IND		أضف قطرة من كاشف كوفاك		ينـتج الإنـدول مِـن أيـض الحـامض الأمينـي تربتوفان، وتكوين الإندول يكشَفُ عنه بظهور اللون الوردي Pink إلى الأحمر.
			أصفر	حلقة حمراء	
10	VP		أضف قطرة من 40% KOH ثم قطرة من 6% α-naphthol		ينـتج مركـب الــ Acetoin مِـنْ مركـب الــ Sodium Pyruvate، ويُستدل عليه بظهور اللـون الأحمـر. اختبـارات الــ VP التقليديـة قَدْ تَسـتغرقُ أربعـة أيـامٍ، لكـن باسـتعمال بيروفـات الصوديوم يختصر وقت الاختبار إلى 18 ساعة. وجـود الكريـاتين Creatine يعـزز اللـون فـي حال الاختبار الإيجابي.
			عديم اللون	أحمر	
11	GEL		عدم انتشار الصبغة	انتشار الصبغة	إسـالة الجلاتـين بواسـطة الإنزيمـات المحللـة للبـروتين انتشـار صـبغة سـوداء تظهـر خـلال الأنبوبة.
12	GLU		أزرق أو أخضر مُزرق	أصفر أو رمادي	استخدام الكربوهيدرات يُؤدّي إلى إنتاج أحماض تؤدي إلى انخفاض الرقم الهيدروجيني pH، مما يؤدي إلى تغير لونِ الدليل إلى الأصفر
13 14 15 16 17 18 19 20	MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA		أزرق أو أخضر	أصفر	
	GLU اختزال النترات إلى نتريت	بعد قراءة تفاعل الجلوكوز أضف قطرتين من 8% حامض سلفونيك وقطرتين من 0.5% مركب N,N-dimethyl-α-naphthylamine			النتريـت تكـون مركـب أحمـر مـع الكاشـف المضاف
		أصفر		أحمر	
	اختزال NO_3 إلى غاز N_2		برتقالي بعد إضافة الكاشف والزنك	فقاقيع، أصفر، بعد إضافة الكاشف والزنك	فـي حالـة النتيجـة السـلبية، فـإن إضـافة الزنـك يثبـت وجـود نتـرات غيـر مختزلـة بواسـطة اختزالها إلى نتريت (لون برتقالي قرنفلي)، أما إذا لم يحصل تغيير في اللون بعد إضافة الزنك، فهذه يعد مؤشر على الاختزال الكامل للنترات إلى غاز النيتروجين أو إلى أمينات.
	MAN INO SOR Catalase		بعد قراءة تفاعل الكربوهيدرات أضف قطرة من 1.5% H_2O_2		إنـزيم الكـاتليز يحـرر غـاز الأكسـجين مـن فـوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2.
			لا توجد فقاعات	ظهور فقاعات	

نظام Enterotube II لتعريف البكتيريا المعوية:

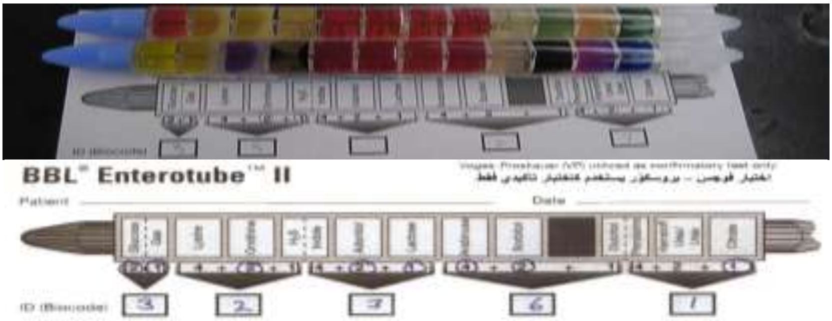
إن نظام Enterotube II عبارة عن أنبوبة بلاستيكية مقسمة إلى 12 قسماً يحتوى كل قسم على بيئة مختلفة، ويستخدم سلك تلقيح خاص يمر خلال البيئات المختلفة، ويبرز طرفه من طرفي الأنبوبة البلاستيكية. ولتلقيح البيئات فإن طرف هذا السلك يتم لمسه في وسط مستعمرة البكتيريا المطلوب تعريفها، ثم يتم سحب السلك من الطرف الآخر، فيمر الجزء الملقح على جميع البيئات ويلقحها، ثم يعاد إدخال السلك ثانية داخل أربعة أقسام من الأنبوبة، وذلك للمحافظة على الظروف المختزلة (اللاهوائية) في داخل هذه الأربعة الأقسام.

الشكل رقم (58) نظام Enterotube II، (جميع النتائج سلبية في الأعلى، وجميعها إيجابية في الأسفل).

وهناك أنظمة أخرى شبيهة بنظام Enterotube II مثل نظام Oxi/Ferm Tube II المستخدم في البكتيريا العصوية السالبة لتصبيغ جرام التي لا تنتمي إلى عائلة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae، وهذه العصويات السالبة لتصبيغ جرام Gram-Negative Rods لا يُمْكن أنْ تُعرف باستعمال نظام Enterotube II، وهكذا فإن استخدام الأنظمة التجارية لتعريف البكتيريا آخذ بالاتساع والانتشار.



الشكل رقم (59) يوضح خطوات العمل بنظام Enterotube II، عن (Benson, 2001).



الشكل رقم (60) يوضح كيفية حساب النتائج الخاصة بنظام Enterotube II.

جدول رقم (2) يوضح تفسير النتائج الخاصة بنظام Enterotube II.

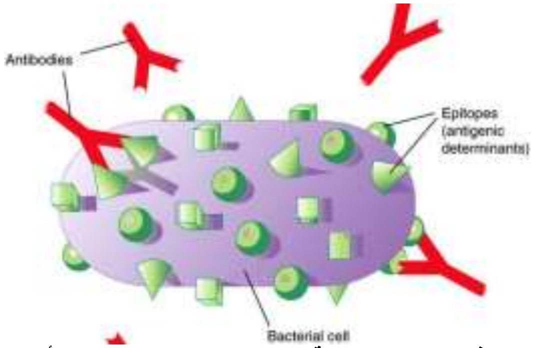
م	الرمز	التفـــــــاعل
1	GLU-GAS	الجلوكوز Glucose (GLU): إن النواتج النهائية مِنْ التخمر البكتيري للجلوكوز تكون أمّا حامض أو حامض وغاز، والتغيير في pH بسبب إنتاج الحامضِ يستدل عليه بتغيير اللونِ مِنْ الأحمرِ (القلوي) إلى الأصفر (الحامضي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأصفرِ يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، أما اللون البرتقالي فيجب أنْ يؤخذ بنظر الاعتبار على أنه تفاعل سلبي. إنتاج الغاز Gas Production (GAS): يحْدثُ فصل كامل لطبقة الشمعَ عن سطحِ وسطِ الجلوكوزَ في حالة أنتاجَ الغازَ بسبب تخمر الجلوكوز، ونسبة ارتفاع طبقة الشمع عن الوسطِ يتفاوت حسب سلالة البكتيريا.
2	LYS	نزع مجموعة الكربوكسيل من اللايسين Lysine Decarboxylase: إن نشاط إنزيم Lysine Decarboxylase يُؤدّي إلى تكوين الناتج النهائي القلويِ Cadaverine، الذي يستدل عليه بتغيّرُ لونِ الدليل مِنْ الأصفر الشاحبِ (الحامضي) إلى اللون الأرجوانِي (القلوي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأرجوانِي يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، فلا يحدث أن يَبْقى الوسطُ أصفراً في حال وجود هذا الإنزيم.
3	ORN	نزع الكربوكسيل من الأورنيثين Ornithine Decarboxylase: يُؤدّي نشاط إنزيم Ornithine Decarboxylase إلى تكوين الناتج النهائي القلويِ Putrescine، الذي يستدل عليه بتغيّرُ لونِ الدليل مِنْ الأصفرِ الشاحبِ (الحامضي) إلى اللون الأرجوانِي (القلوي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأرجوانِي يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، فلا يحدث أن يَبْقى الوسطُ أصفراً في حال وجود هذا الإنزيم.
4	H_2S/IND	إنتاج كبريتوز الهيدروجين H_2S Production (H_2S): يتحرّرَ كبريتوز الهيدروجين بواسطة البكتيريا المختزلة للمركبات المحتوية على الكبريتِ مثل الببتون وثيوكبريتات صوديوم، ويتفاعل H_2S مع أملاحِ الحديد الموجودة في الوسطِ ليكون راسب أسود من كبريتوز الحديدوز ويكون ذلك عادة على طول خَط التلقيحِ. قَد تنتج بعض سلالات بكتيريا Proteus و Providencia لون بني في هذا الوسطِ، وذلك ليس دليل على إنتاج H_2S. تكون الإندول Indole Formation (IND): إن إنتاج الإندول مِنْ أيض الحامض الأميني تربتوفان بواسطة إنزيم Tryptophanase البكتيري يكشَفُ عنه بظهور اللون الوردي Pink إلى الأحمرِ بعد إضافة كاشف كوفاك Kovac's reagent.
5	ADON	تخمر الأدونيتول Adonitol (ADON): التخمر البكتيري لمركب الأدونيتول Adonitol، يُؤدّي إلى تشكيلَ نواتج نهائية حامضية، يُستدل عليه بواسطة تغيّرُ لون الدليل الموجود في الوسطِ مِنْ الأحمرِ (قلوي) إلى الأصفر (حامضي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأصفرِ يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، أما اللون البرتقالي فيجب أنْ يؤخذ بنظر الاعتبار على أنه تفاعل سلبي.
6	LAC	تخمر اللاكتوز Lactose (LAC): التخمر البكتيري لسكر اللاكتوز Lactose، يُؤدّي إلى تشكيلَ نواتج نهائية حامضية، يُستدل عليه بواسطة تغيّرُ لون الدليل الموجود في الوسطِ مِنْ الأحمرِ (قلوي) إلى الأصفر (حامضي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأصفرِ يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، أما اللون البرتقالي فيجب أنْ يؤخذ بنظر الاعتبار على أنه تفاعل سلبي.

7	ARAB	تخمر الأرابينوز Arabinose (ARAB): التخمر البكتيري للأرابينوز Arabinose، يُؤدّي إلى تشكيلَ نواتج نهائية حامضية، يُستدل عليه بواسطة تغيّرُ لون الدليل الموجود في الوسطِ مِنْ الأحمرِ (قلوي) إلى الأصفر (حامضي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأصفرِ يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، أما اللون البرتقالي فيجب أنْ يؤخذ بنظر الاعتبار على أنه تفاعل سلبي.
8	SORB	تخمر السوربيتول Sorbitol (SORB): التخمر البكتيري للسوربيتول Sorbitol، يُؤدّي إلى تشكيلَ نواتج نهائية حامضية، يُستدل عليه بواسطة تغيّرُ لون الدليل الموجود في الوسطِ مِنْ الأحمرِ (قلوي) إلى الأصفر (حامضي)، وأيّ درجة من درجات اللون الأصفرِ يَجِبُ أَنْ تُفسر كردّ فعل إيجابي، أما اللون البرتقالي فيجب أنْ يؤخذ بنظر الاعتبار على أنه تفاعل سلبي.
9	V.P.	فوجس – بروسكوّر Voges-Proskauer (V.P): مركب Acetylmethylcarbinol (Acetoin) عبارة عن مركب وسطي في عملية إنتاجِ Butylene Glycol مِنْ تخمر الجلوكوزِ. إنّ وجود الـ Acetoin يُستدل عليه بظهور لون أحمر خلال فترة 10 – 20 دقيقة.
10	DUL-PA	تخمر الدولسيتول Dulcitol (DUL): التخمر البكتيري للدولسيتول Dulcitol، يُؤدّي إلى تشكيلَ نواتج نهائية حامضية، ويُستدل عليه بواسطة تغيّرُ لون الدليل الموجود في الوسطِ مِنْ اللون الأخضرِ (قلوي) إلى اللون الأصفر أَو الأصفر الشاحب (حامضي). نزع الأمين من الفينيل الأنين Phenylalanine Deaminase (PA): يَكتشف هذا الاختبار تكون حامض الفينيل بيروفيك Phenylpyruvicمِن حامض الفينيل الأنين منزوع الأمين، حامض الفينيل بيروفيك المتكون يتفاعل مع ملح كلوريد الحديديك في الوسطِ لإنْتاج لون يتراوح بين اللون الأسود المميز إلى اللونِ الرماديِ المدخن.
11	UREA	اليوريا Urea (UREA): إنتاج إنزيم Urease من قبل بعض أنواع البكتيريا المحللة لليوريا يؤدي إلى إنْتاج الأمّونيا، الأمر الذي يُسبّبُ تغيير في الرقم الهيدروجيني pH وتغير لون الوسط مِنْ الأصفرِ (حامضي) إلى الأرجوانِ المحمّرِ (قلوي)، وهذا الاختبار موجب لأنواع Proteus في ٦ ساعات، كما يعطي نتيجة إيجابية ضعيفة لأنواع Klebsiella وبعض Enterobacter خلال ٢٤ ساعة.
12	CIT	استهلاك السترات Citrate (CIT): تستطيع كثير من البكتيريا استعمال السترات كمصدر وحيد للكربون، وهذه البكتيريا تنتج مواد قلوية الأمر الذي يُغيّرُ لونَ الدليل الموجود في الوسط مِنْ الأخضرِ (حامضي) إلى الأزرق الغامق (قلوي) وأيّ درجة من درجات اللون الأزرقِ يجب أنْ تؤخذ بنظر الاعتبار على أنها نتيجة إيجابية.

وكما في نظام API، يتم عقب التحضين حساب النتائج الموجبة والسالبة للحصول على شفرة عددية مكونة من خمس ارقام في حال نظام Enterotube II (وسبع أرقام في حالة نظام API 20E كما سبق توضيحه)، ويتم استخدام هذه الشفرة العددية لتصنيف العزلة البكتيرية المجهولة بمقارنتها بالنتائج الموجودة في بنك المعلومات الذي يحتوي على سلسلة من التصنيفات تشير إلى الاحتمال الإحصائي الذي يحدد بكتيريا بعينها تعطي هذا الاحتمال الإحصائي.

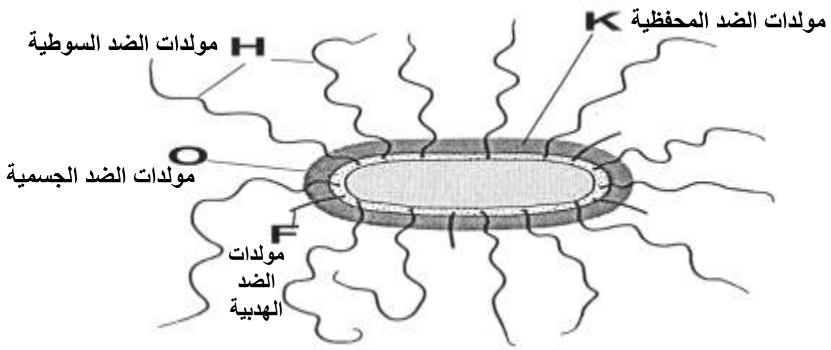
الصفات المصلية (السيريولوجية) Serological Characteristics:

علم الأمصال (السيريولوجي) Serology هو العلم الذي يختص بدراسة مصل الدم وما يحتويه من الاستجابات المناعية، وتعمل الخلايا البكتيرية كمولد للمضادات أو كأنتيجينات Antigens أي عند دخولها جسم الإنسان أو الحيوان فإنها تستحثه على تكوين أجسام المضادة Antibodies خاصة نتيجة للتركيب الأنتيجيني Antigenic structure لتلك البكتيريا وهذا ما يعرف بالقدرة التحصينية لأجسام الحيوانات ضد البكتيريا التي تهاجمها، وقد مكن ذلك من عزل بعض مواد لها أهميتها في أغراض التعريف أو التقدير الكمي لما يحتويه الجسم المصاب من أنواع البكتيريا المختلفة.



الشكل رقم (61) مولدات الضد في الخلايا البكتيرية تستحث الجسم على تكوين الأجسام المضادة Antibodies.

ويجب أن نعلم أن خلية البكتيريا تحتوى على العديد من الأنتيجينات المختلفة أو أجزاء منها وأن كل منها يتكون له بجسم العائل أجسام مضادة خاصة به، فمجاميع البكتيريا ذات القرابة الوثيقة Closely related (التي تنتمي إلى جنس أو نوع واحد) قد تحتوي على أنتيجينات متشابهة ولكنها قد تظهر طرزاً سيريولوجية مختلفة نظراً لأن هذه المجاميع لا تشترك في محتوياتها من الأنتيجينات المميزة للطرز المختلفة.



الشكل رقم (62) يوضح مولدات الضد (الأنتيجينات Antigens) المختلفة في الخلية البكتيرية.

إن المواد التي تعرف بالأمصال المضادة **Antisera** يكون لها قدرة تخصصية مرتفعة فهي تتكون بجسم الحيوان نتيجة لحقنه ببعض المواد الذائبة الممكن استخلاصها من الخلايا البكتيرية أو المواد العالقة المكونة من جزيئات غير ذائبة **Particulate** مثل الخلايا الكاملة أو الجدر الخلوية أو البروتوبلاستات العارية. والأجسام المضادة هي بروتينات تنتشر مع الدم داخل الجسم وتتحد بطريقة خاصة جدا مع الخلايا البكتيرية التي استحثت تكوينها، فعلى سبيل المثال عندما يحقن جسم الأرنب بخلايا ميتة من بكتيريا التيفود (أنتيجينات التيفود) فإنها تستحث الجهاز المناعي في جسم الأرنب لتكوين الأجسام المضادة لبكتيريا التيفود. والأنتيجين الفردي يمكنه أن يتفاعل مع المصل المضاد له بعدة طرق في مختلف الظروف، فمثلا إذا حصن أرنب بخلايا مضعفة حرارياً **Heat attenuated** من ميكروب التيفود فإن دم هذا الحيوان سوف يحتوى على أجسام مضادة خاصة بخلايا هذا الميكروب. وعند خلط كمية من مصل دم من هذا الحيوان مع معلق خلايا هذه البكتيريا فإنه يتكون ما يسمى بالملبدات **Agglutinins** أما إذا خلط المصل المضاد بمستخلصات خلوية بدلاً من الخلايا الكاملة فإنه يتكون بالمخلوط رواسب **Precipitations**.

وتتوافر محاليل الأمصال المضادة (**Antisera** = الأمصال التي تحتوى على الأجسام المضادة) بصورة تجارية، وهى تستخدم في التعرف على العديد من أنواع البكتيريا ذات الأهمية الطبية، فعندما يتم عزل بكتيريا غير معروفة من أحد المرضى، فيمكن اختبارها مع عدة أنواع من الأجسام المضادة المعروفة، وغالبا ما يتم التعرف عليها بسرعة وسهولة.

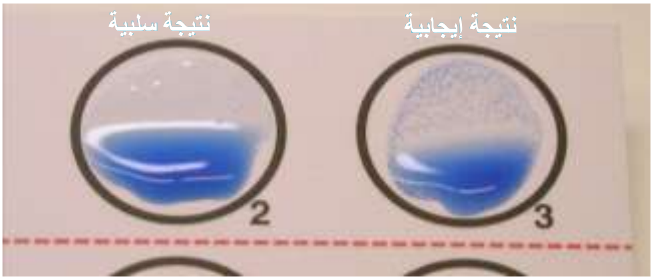
وتتلخص صفات هذه الأمصال المضادة فيما يلي:

1- قدرتها التخصصية المرتفعة.
2- حساسيتها الزائدة.
3- السهولة النسبية في تحضيرها.
4- اتساع مجال المواد التي يمكن أن تتكون نتيجة لوجودها بأجسام الحيوانات.

الطرق الوصفية لاستعمال الأمصال المضادة:

1- الاختبارات التلبدية Agglutination Tests:

من السهل جداً إجراء الاختبارات التلبدية وتفسير نتائجها، لذلك فهي الطريقة السيرولوجية المفضلة لاختبار وتحضير الأنتيجين الخلوي المناسب، وفى حالة احتواء الخلايا على تركيب أنتيجيني عام فإنه يمكن التفرقة بين أنواع البكتيريا بإتباع طريقة امتصاص الملبدات. وفي اختبار التلبد الشريحي **Slide Agglutination** يتم وضع نقطة من محلول ملحي لمعلق البكتيريا غير المعروفة على عدة شرائح زجاجية، ثم تضاف أمصال مضادة مختلفة ومعروفة إلى كل منها على الشرائح، يتم تلبد (تجمع على شكل كتل) البكتيريا التي تخلط بأجسام مضادة تكونت نتيجة استحثاثها بهذا النوع أو السلالة من البكتيريا، وفى هذه الحالة يعتبر الاختبار إيجابيا.



الشكل رقم (63) يوضح اختبار التلبد الشريحي **Slide Agglutination test**.

ومن ضمن أمراض الإنسان التي تستعمل فيها الاختبارات التلبدية كوسيلة من الوسائل التشخيصية الحمى التيفودية، والأمراض الناتجة عن الأنواع التابعة لجنس ***Brucella*** والأمراض الناتجة عن الأنواع التابعة لجنس ***Salmonella***، ولا يقتصر استعمال الاختبارات التلبدية على تشخيص الأمراض المعدية بالمعمل نتيجة لحدوث التلبد بأنتيجين معلوم مع مصل دم الإنسان المصاب، بل يمكن أيضاً عن طريقها التعرف على الأنواع المجهولة من البكتيريا أو الفيروسات بمعرفة قدرة الأمصال المضادة المعلومة في تلبيد خلايا أو جزيئات المزارع المجهولة. والاختبار المعروف باسم اختبار فيدال **Widal test** قصد به أول الأمر التعرف على الإصابة بالحمى التيفودية حيث يختبر تلبد مزرعة ميكروب التيفود بمصل من دم الإنسان المصاب، لكن لا يقتصر استعمال هذا الاختبار على هذا المرض فقط بل يستعمل في التعرف على الإصابات البكتيرية بكائنات أخرى غير ميكروب التيفود ***Salmonella typhi*** حيث يعطي نتائج إيجابية معها مما يعطي نتائج مضللة.

وهناك اختبار تلبدي آخر يعرف باسم تفاعل فيل- فيلكس **Weil-Felex reaction** ويعتمد هذا الاختبار على الحقيقة القائلة بأن عدد من الريكيتسا ***Rickettsia*** تمتلك أنتيجين عام ومشابه لذلك المتواجد بخلايا أنواع الجنس ***Proteus*** ولذلك فإن مصل دم الحيوانات المصابة بالريكيتسا يمكنها أن تلبد معلق من الخلايا التابعة لجنس ***Proteus***.

2- اختبارات الترسيب **Precipitation Tests**:

في اختبارات الترسيب تستعمل أنتيجينات ذائبة مثل مستخلصات الخلايا البكتيرية، وهذه تخلط بالأجسام المضادة الخاصة بها، وفي حالة الاختبارات الإيجابية تتكون رواسب مميزة وبهذه الطريقة يمكن التعرف على المستخلصات البكتيرية أو بقع الدم باستعمال الأمصال المضادة المعروفة، وتستعمل هذه الطريقة أيضاً في أغراض التعرف على العوامل المعدية من بعض الأمراض مثل الجمرة الخبيثة عندما يخلط أنتيجين معلوم به مصل من دم الحيوان المصاب ويجرى اختبار الترسيب بخلط الأنتيجين مع المصل المضاد في أنبوبة ضيقة ومشاهدة تكون حلقة ترسيبية في مكان اتصالهما.

3- اختبارات تثبيت المواد المكملة Complement fixation Tests:

تعتمد هذه الاختبارات على وجود أجسام مضادة محللة للخلايا Cytolytic في مصل الدم تتكون بجسم الحيوان عقب حقنه بأنتيجينات (خلايا بكتيرية أو كرات دم حمراء) وتجرى اختبارات تثبيت المواد المكملة هذه للتأكد من وجود أو غياب محللات بكتيرية معينة بمصل الحيوان.

4- صبغ الأجسام المضادة بصبغات فلورسنتية Fluorescent Antibodies Tests:

في هذا الاختبار يضاف مركب فلووسنتي (Fluoresein Isocyante) إلى الجاما جلوبيولين δ-globulins بدرجة لا تؤثر على نشاطه، وعند التصاق الأجسام المضادة بالأنتيجين يصبغ الأخير بطريقة تسهل مشاهدته وفحصه مجهرياً بالمجهر ذو الإضاءة فوق البنفسجية.

وهذه الطريقة مفيدة في حالة الأنتيجينات غير الذائبة وكون هذه المادة الفلورسينتية تخصصية في صبغ الجدر الخلوية لذلك فهي طريقة مفيدة جداً في تصنيف البكتيريا باستعمال أمصال فلورسنتية Fluorescent Reference Sera سبق التعرف عليها، وعند استعمال خلايا كبيرة (أكبر حجماً من البكتيريا الحقيقية) فإن هذه الطريقة يمكن إتباعها لتحيد أنتيجينات معينة داخل هذه الخلايا.

وقد تم سابقاً تقسيم بكتيريا Streptococci إلى عدة طرز سيرولوجية باستخدام التفاعلات السيريولوجية. فقد وجد أن الأنتيجينات المختلفة التي توجد في جدر الطرز السيريولوجية المختلفة لبكتيريا Streptococci تستحث الجسم لتكوين أنواع مختلفة من الأجساد المضادة. وعلى النقيض من ذلك فنظراً لأن أنواع البكتيريا المتقاربة تستطيع أيضا أن تكون بعض الأنتيجينات المتشابهة، فعلى ذلك يمكن استخدام الاختبارات السيريولوجية للبحث عن أوجه التشابه بين هذه الأنواع من البكتيريا، فإذا ما تفاعل المصل المضاد مع بروتينات عدة أنواع أو سلالات مختلفة من البكتيريا فيمكن حينئذ عمل اختبارات إضافية لإيجاد طبيعة العلاقات بينها.

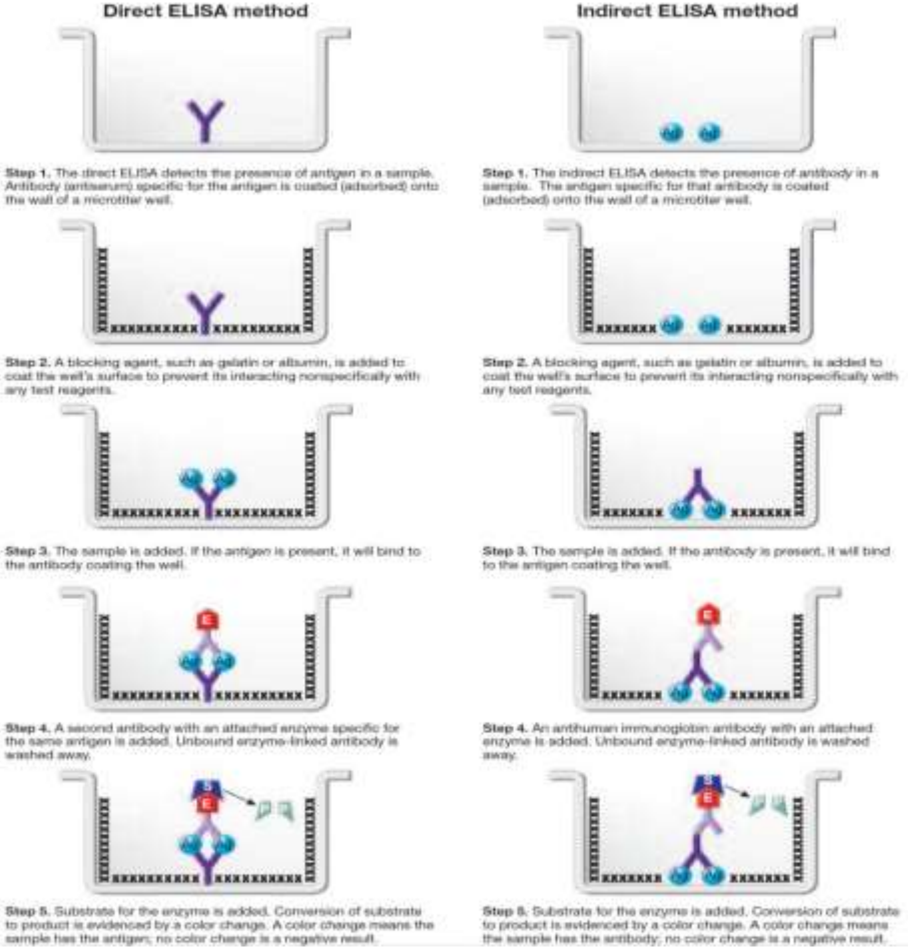
5- تقدير الإدمصاص المناعي بالإنزيم المرتبط (ELISA)

Enzyme Linked Immunosorbent Assay:

وهى من أكثر الطرق المستخدمة الآن نظرا لسرعتها وإمكانية قراءة نتائجها بواسطة ماسح مدمج مع الحاسوب Computer Scanner. وهناك طريقة مباشرة لتقدير الإدمصاص المناعي بالإنزيم المرتبط ELISA يتم فيها وضع أجسام مضادة في حلقات مجوفة (أطباق صغيرة Microplates) ثم يضاف أنواع مختلفة غير معروفة من البكتيريا في كل حلقة، بالإضافة إلى عينات ضابطة ويترك الطبق لمدة زمنية محددة ليتم التفاعل، وبعد الغسيل يتم إضافة مضاد النوع المرتبط بالإنزيم فيتم استخدام جزيئات من الأجسام المضادة متخصصة (الجاماجلوبيولين δ-globulins التي تم تكوينها من قبل في جسم حيوان التجارب) وتعليم هذه الجزيئات بأنزيم من البيروكسيديز يتميز بأن مادة التفاعل الخاصة به عديمة اللون

ولكن عند إتمام التفاعل الذي يساعد فيه الأنزيم يصبح ناتج التفاعل ملوناً، حيث يترك الطبق لمدة زمنية محددة في مكان مظلم بعدها يتم إيقاف التفاعل بتغيير pH الوسط باستعمال حامض مخفف، ثم تتم قراءة شدة اللون بالعين أو باستخدام جهاز قراءة طيفي (ELISA reader) حيث تكون هناك علاقة طردية بين كمية الأجسام المضادة بالعينة و شدة اللون. ويتم التعرف على نوع البكتيريا عند حدوث تفاعل بين الأجسام المضادة المعروفة والبكتيريا المضافة. كما أن هناك أيضاً طريقة غير مباشرة لتقدير الإدمصاص المناعي بالإنزيم المرتبط ELISA يتم فيها وضع أنتيجينات لبكتيريا محددة في الحلقات.

وقد تم تطبيق هذه الطريقة على نطاق واسع لاكتشاف الأنتيجينات البكتيرية والفيروسية على سبيل المثال اختبارات ELISA في الكشف عن وجود مرض الايدز AIDS وذلك بتحديد وجود أجسام مضادة ضد الفيروس، كما أنها أفادت في دراسة بعض الأمراض الطفيلية، إضافة إلى ذلك فإن هذه الطريقة تستخدم بغرض التقدير الكمي والوصفي للجزيئات الخلوية الكبيرة.

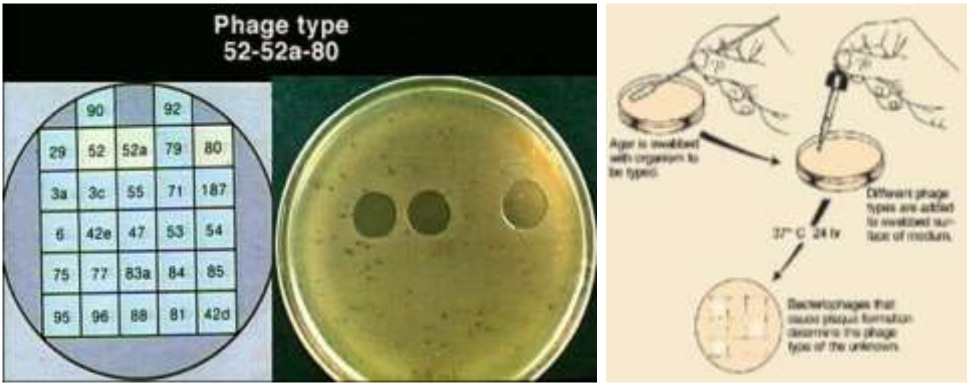


الشكل رقم (64) تقنية ELISA المباشرة وغير المباشرة عن (Leboffe and Pierce, 2011).

الطرز الفاجية Phage Typing:

تشبه الطرز الفاجية الاختبارات السيرولوجية في أنها تبحث عن أوجه التشابه بين البكتيريا. والطراز الفاجي هو اختبار لتحديد نوع الفاج (البكتيريوفاج Bacteriophage) الذي يستطيع إصابة بكتيريا معينة، والبكتيريوفاجات كما عرفنا من قبل هي فيروسات تصيب البكتيريا وعادة ما تسبب هلاك الخلايا التي تصيبها. وهي تتميز بدرجة تخصص دقيق جدا، وهي عادة ما تصيب أعدادا محدودة فقط من نوع معين من البكتيريا، أو قد يكون الفاج متخصصا في إصابة سلالة معينة لأحد أنواع البكتيريا، ففي الوقت الذي تكون فيه إحدى السلالات قابلة للإصابة بنوعين من الفاجات تكون هناك سلالة أخرى من نفس نوع البكتيريا تصاب بنفس نوعي الفاجات السابقة بالإضافة إلى نوع ثالث.

وفي الطرق الفاجية للتعرف على البكتيريا (كما تم وصف ذلك قبلاً)، يتم زراعة البكتيريا تحت الاختبار على سطح وسط غذائي صلب في طبق بتري في ثم تختبر الأنواع المختلفة من الفاجات بوضع نقطة من محلول كل فاج على البكتيريا، وعند تعرض البكتيريا لأحد الفاجات التي تستطيع إصابتها تظهر مناطق خالية من النمو البكتيري تسمى Plaques تتخلل نمو الغشاء البكتيري في طبق بتري.



الشكل رقم (65) يوضح تقنية الطرز الفاجية Phage Typing لتشخيص البكتيريا، عن (Benson, 2001).

التصنيف الكيميائي Chemotaxonomy:

يستخدم التصنيف الكيميائي لتعريف وتقسيم البكتيريا، وهو يعتمد أساساً على الاختلافات التي توجد في تركيبها الكيميائي، وتستخدم الاختلافات الخاصة التي توجد في تركيب الجدار الخلوي والليبيدات والبروتينات العامة كصفات أخرى إضافية ذات قيمة كبيرة في طرق التصنيف.

- **تعاقب الأحماض الأمينية Amino Acid Sequencing:**

تعتمد مصادر الحصول على الكثير من المعلومات على دراسة تتابع الأحماض الأمينية في البروتينات حيث يعكس تتابع الأحماض الأمينية في البروتين بصورة مباشرة تتابع القواعد النيتروجينية التي توجد في الحامض النووي DNA الذي يحمل شفرة تكوين البروتين. وعلى ذلك فإن مقارنة تتابع الأحماض الأمينية التي توجد في نوعين مختلفين من البكتيريا يمكن أن يؤدي إلى تحديد أوجه التشابه في التتابعات التي توجد في الحامض النووي DNA وكلما زادت درجة تشابه البروتينات كلما زادت درجة التقارب بين نوعى البكتيريا. ويستخدم تتابع الأحماض الأمينية لدراسة علاقة التقارب الوراثي Phylogenetic relationship في عدة أنواع رئيسة من البروتينات مثل سيتوكروم س Cytochrome C في الأنواع المختلفة من البكتيريا، ويقتصر استخدام تتابع الأحماض الأمينية على مجموعات البكتيريا التي تشترك في نوع واحد عام بين البروتين، مع العلم أنه لا يفترض أن جميع أنواع البكتيريا التي تشترك في نوع واحد من البروتين تكون بالضرورة ذات علاقات متقاربة.

- **تركيب البروتين Protein Composition:**

من المعايير المستخدمة أيضاً في إيجاد العلاقة بين أنواع البكتيريا المختلفة إضافة إلى مقارنة تتابع الأحماض الأمينية، دراسة صفات البروتينات العامة التي توجد بها. وتعتمد هذه الطريقة على أن أساس علاقة التشابه بين أنواع البكتيريا تتناسب مع درجة التشابه في تتابع الأحماض الأمينية في البروتينات أو الأنزيمات المشتركة بينها.

- **تحليل البروتين Protein Analysis:**

تركز دراسة تتابع الأحماض الأمينية على التتابع الذي يوجد في نوع واحد أو عدد محدود من البروتينات العامة المشتركة بين الأنواع المختلفة من البكتيريا. ويقارن تحليل البروتين نماذج تحليل جميع البروتينات التي توجد في الخلايا المختلفة. ونظراً لأن بروتينات الخلية هي نتاج لنشاطها الجيني، فمن المتوقع حينئذ أن يقوم كل نوع من البكتيريا بتكوين مجموعة خاصة من البروتينات ينفرد بها وتميزه، وبناء على هذه القاعدة يتم عمل صورة لبروتينات الخلية (Protein Profile).

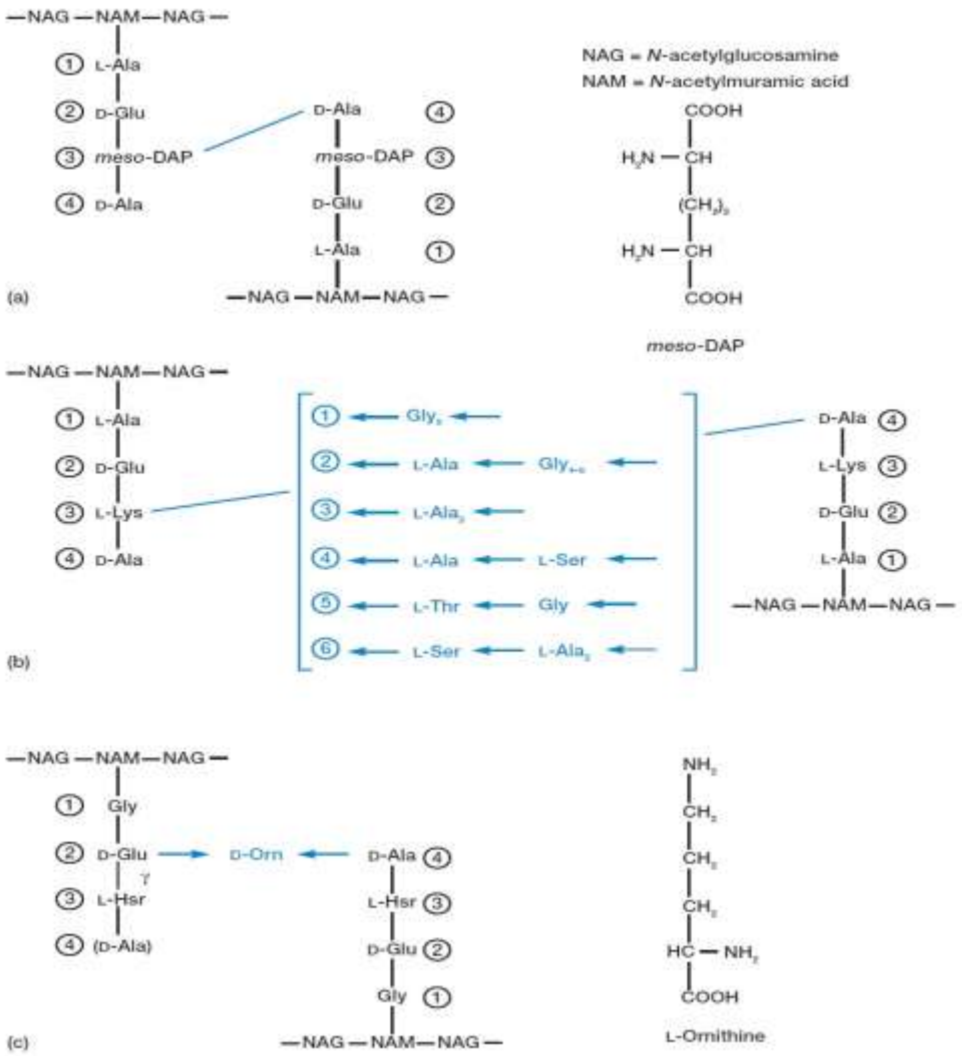
ويتم عمل صور البروتين باستخدام طريقة الفصل الكهربائي على هلام عديد الاكريلاميد Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE)، وفي هذه الطريقة يتم استخلاص البروتينات بعد تحلل الخلايا ثم تذاب في محلول معين وتوضع عينة من المحلول الناتج على لوح رقيق من هلام عديد الاكريلاميد ثم يتم إمرار تيار كهربائي في الهلام، تبدأ بعدها جزيئات البروتينات المختلفة في التحرك في الهلام بسرعات مختلفة تبعا لحجمها والشحنة التي يحملها كل نوع، وبعد صبغ الهلام يظهر النموذج المميز لبروتينات الخلية. وإذا افترضنا أن أنواع البكتيريا المتشابهة لها نماذج متطابقة من البروتينات، فإن نماذج الأنواع شديدة التقارب سيكون بينها اختلافات بسيطة جداً بينما تزداد هذه الاختلافات وتكون واضحة كلما ازداد تباعد العلاقة بين أنواع البكتيريا. ومع أن ازدياد تطور التقنيات والمواد المستخدمة فقد أصبح من الممكن استخدام هذه الطريقة كوسيلة لتعرف البكتيريا ومن ثم تصنيفها. وعند مقارنة صورة بروتين أحد الخلايا غير المعروفة مع مجموعة صور قياسية من البروتينات يمكن التعرف على نوع البكتيريا غير المعروفة.

- تركيب الليبيدات **Lipid Composition:**

يستخدم أيضا تركيب الليبيدات والأحماض الدهنية التي تكون الغشاء البلازمي والأغلفة المحيطة بالبكتيريا كأدوات لتعريفها، ومن أهم أمثلتها أحماض الميكوليك **Mycolic acids** وهي سلسلة مركبة ومتفرعة من الأحماض الدهنية الهيدروكسيلية **β-Hydroxy Fatty Acids** والتي توجد فقط في بعض أنواع معينة من البكتيريا وتشمل جنس ***Mycobacterium*** الذي يضم الأنواع المسببة لمرض السل **Tuberculosis** والجذام **Leprosy**، وجنس ***Corynebacterium*** وتشمل النوع المسبب لمرض الخُناق **Diphtheria**. وتستخدم الاختلافات في طول أو حجم سلاسل الهيدروكربونات المكونة لأحماض الميكوليك **Mycolic** للتمييز بين أنواع البكتيريا التي تكون هذه الليبيدات.

- تركيب الجدار الخلوي **Cell Wall Composition:**

تعتبر الاختلافات التي توجد في تتابع الأحماض الأمينية وتركيب السكريات بالإضافة إلى طبيعة التركيب الكيميائي لمادة الببتيدوجليكان صفات ذات أهمية كبرى في تقسيم البكتيريا الموجبة لصبغ جرام، إلا أن هذه الطريقة لم تثبت فاعليتها في التفرقة بين أنواع البكتيريا السالبة لصبغ جرام، نظراً لتجانس طبيعة تركيب طبقة الببتيدوجليكان في جدرها الخلوية، والشكل التالي يوضح ذلك.



(a) طبقة الببتيدوجليكان يتصل فيها مركبي N-acetylglucosamine و N-acetylmuramic acid بأواصر جلايكوسيدية (ß-1,4 glycosidic bond) ويتصل بمركب N-acetylmuramic acid سلسلة من عديد الببتيد يتكون من أربع أحماض أمينية هي (L-Ala و D-Glu و meso-DAP و D-Ala)، وهنا يتصل الحامض الأميني D-Ala في الموقع 4 لسلسلة عديد الببتيد في الطبقة الأولى بأصرة ببتيدية مباشرة مع الحامض الأميني meso-DAP في الموقع 3 للسلسلة في الطبقة الثانية، وهذه الحالة تكون في غالبية البكتيريا السالبة لتصبيغ جرام وعدد من البكتيريا الموجبة لتصبيغ جرام.

(b) الحامض الأميني في الموقع 3 لسلسلة عديد الببتيد هو L-Lys، ويتصل معه D-Ala في الموقع 4 بمجموعة من الأحماض الأمينية تختلف باختلاف أنواع البكتيريا كما هو موضح أعلاه، (1) *Staphylococcus aureus*، (2) *S. epidermidis*، (3) *Micrococcus roseus* و *Streptococcus thermophilus*، (4) *Lactobacillus viridescens*، (5) *Streptococcus salvarius*، (6) *Leuconostoc cremoris*، وتُشيرُ الأسهمُ إلى قطبية الأواصر الببتيدية تكون في اتّجاه مجموعة الكربوكسيل نحو مجموعة الأمين في هذه الأحماض الأمينية.

(c) الحامض الأميني في الموقع 3 هو الهموسيرين L-Hsr، والاتصال يكون بين D-Glu في الموقع 2 مع D-Ala في الموقع 4 بواسطة الحامض الأميني الأورنيثين وذلك في بكتيريا *Corynebacterium poinsettiae*.

الشكل رقم (66) طبقة الببتيدوجليكان في الجدار الخلوي لأنواع من البكتيريا، عن (Prescott, *et al.* 2002).

الاتجاه الوراثي في التقسيم:

- تركيب قواعد الأحماض النووية **Nucleic Acids Bases Composition:**

هي أحدى تقنيات تصنيف البكتيريا التي أصبحت تستخدم الآن على نطاق واسع نظراً لما تتميز به من إمكانيات كبيره لوضع افتراضات للتقارب الوراثي للبكتيريا بواسطة تحديد تركيب القواعد النيتروجينية للحامض النووي DNA وعادة ما يتم التعبير عن تركيب القواعد النيتروجينية بتحديد النسبة بين قاعدتي الجوانين والسيتوسين (G + C) فإذا كان تركيب القواعد النيتروجينية للنوع الواحد صفه ثابتة من الناحية النظرية، فان مقارنة نسبة وجود (G + C) في أنواع البكتيريا المختلفة يمكن أن يوضح درجه العلاقة والتقارب بين أنواعها المختلفة.

وفي الحامض النووي DNA تتكامل قاعدة الجوانين G مع قاعدة السيتوسين C وقاعدة الثيامين T مع قاعدة الأدنين A، وعلى ذلك فإن نسبة القواعد النيتروجينية G + C في الحامض النووي DNA سوف تدل أيضاً على نسبة القواعد T + A، (حيث أن نسبة G + C إصافة إلى نسبة T + A تساوي 100 %)، ومن ثم ففي نوعى البكتيريا ذات العلاقات المتقاربة تشابه بل ويتطابق العديد من جيناتها وتحتوى على كميات متشابهة من القواعد المختلفة في أحماضها النووية، ومع ذلك فإن كان الاختلاف بينهما أكثر من 10 % في نسبة أزواج القواعد G + C (ومع ذلك، إذا ما احتوى الحامض النووي DNA لأحد أنواع البكتيريا على نسبة 40 % من القواعد G + C والنوع الأخر من البكتيريا أيضاً على نسبة 40 % من قواعد G + C، فحينئذ قد لا يكون هناك علاقة بين هذين النوعين من البكتيريا)، حيث أن أنواع البكتيريا التي لها نفس نسبة القواعد G + C ليس بالضرورة أن تكون بينها علاقة متقاربة، ويحتاج ذلك إلى نتائج أخرى إضافية للتوصل إلى استنتاج لطبيعة العلاقة الوراثية بينهما. وقد أصبح من الممكن الآن باستخدام التقنيات الحديثة للكيمياء الحيوية تحديد التتابع الكامل للقواعد النيتروجينية للحامض النووي DNA الذي يوجد في البكتيريا.

وقد أمكن مقارنة تتابع القواعد النيتروجينية في نوعين مختلفين من البكتيريا باستخدام إنزيمات التحديد **Restriction enzymes**، والتي تقوم بقطع جزي الحامض النووي DNA في أماكن مختلفة حيثما يوجد تتابع معين من القواعد النيتروجينية، وينتج عن ذلك تكوين قطع محددة **Restriction fragments** وفي هذه الطريقة يتم معاملة الحامض النووي DNA في كلا نوعي البكتيريا بواسطة إنزيم تحديد واحد ثم يتم فصل القطع المحددة الناتجة بواسطة الفصل الكهربائي على طبقة رقيقة من الآجاروز **Agarose**، ثم يتم مقارنة عدد وأحجام القطع المحددة

الناتجة من كلا النوعين للدلالة على مدى التشابه والاختلاف في الصفات الوراثية بين نوعى البكتيريا وكلما ازدادت درجة التشابه كلما ازدادت درجة التقارب بين نوعى البكتيريا.

وفي الحالات التي يصعب فيها زراعة أو إكثار البكتيريا بواسطة الطرق المعتادة، يتم اللجوء إلى تقنية التفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميريز **Polymerase Chain Reaction (PCR)** لزيادة كمية الحامض النووي **DNA** الخاص بالبكتيريا إلى الحد الذي يمكن اختباره بواسطة الفصل الكهربائي **Electrophoresis**.

وتعتمد تقنية التفاعل المتسلسل لإنزيم البوليميريز **(PCR)** على وجود نسخ مفردة الحامض النووي **DNA** المراد تضخيمه، إضافة إلى بادئة (مناسبة) خاصة به وأنزيم بلمرة **DNA**. يعتبر أنزيم البلمرة **Taq** من أفضل الأنزيمات المستخدمة في هذه العملية نظراً لقابليته العالية على البلمرة بدرجات حرارة عالية واستقراريته بدرجات الحرارة المستخدمة في فصل الأشرطة المزدوجة والتي تصل إلى 95°م.

- تهجين الحامض النووي **Nucleic Acid Hybridization:**

إذا ما تعرضت سلسلتا جزيء الحامض النووي **DNA** للحرارة فسوف تنفصل السلسلتان المتكاملتان نتيجة لتحطيم الروابط الهيدروجينية بين القواعد، وإذا ما تم تبريد السلاسل الفردية ببطء فسوف يؤدى ذلك إلى إعادة اتحادها مرة أخرى لتكون سلسلتي جزيء الحامض النووي **DNA** التي تكون مطابقة تماماً للسلاسل المزدوجة الأصلية، ويحدث إعادة الاتحاد نتيجة لتكامل تتابع القواعد النيتروجينية بين كلا السلسلتين المنفردتين. وعندما تستخدم هذه الطريقة لفصل سلاسل الحامض النووي **DNA** لنوعين مختلفين من البكتيريا، فيمكن حينئذ تحديد درجة التشابه بين تتابع القواعد بين النوعين، وتسمى هذه الطريقة بتهجين الحمض النووي **Nucleic Acid Hybridization**، وقد بنيت فكرة هذه الطريقة بافتراض أنه إذا ما تشابه نوعان من البكتيريا أو كانت بينهما علاقة تشابه فسوف يتشابه الجزء الأكبر من تتابع أحماضها النووية، وتقوم هذه الطريقة بقياس مقدرة سلاسل الحامض النووي **DNA** لأحد أنواع البكتيريا في تهجين (الارتباط بواسطة أزواج القواعد المتكاملة) سلاسل الحامض النووي **DNA** لنوع أخر، وكلما ازدادت درجة التهجين بين تلك السلاسل كلما كان الارتباط وثيقا بين أنواع البكتيريا المختبرة.

وبنفس الطريقة يستخدم تهجين سلسلتي الحامضين النوويين **DNA** و **RNA**، وكما نعلم أن الحامض النووي **RNA** يتكون من سلسلة واحدة مفردة يتم نسخها من سلسلة واحدة من الحامض النووي **DNA** ويعنى ذلك أن السلسلة الخاصة من الحامض النووي **RNA** تكون

متكاملة لسلسلة قالب الحامض النووي DNA التي قامت بنسخها، وإنها تستطيع أن تهجن السلسلة المنفصلة من الحامض النووي DNA. ويمكن استخدام هجين سلسلتي الحامضين النوويين DNA و RNA لتحديد درجة العلاقة بين الحامض النووي DNA لأحد أنواع البكتيريا والحامض النووي RNA لنوع آخر من البكتيريا.

ويمكن التعرف على أنواع البكتيريا المجهولة باستخدام طرق التعرف السريعة التي تعتمد على استخدام مجسات الحامض النووي DNA probes وفي إحدى هذه الطرق يتم كسر الحامض النووي DNA لبكتيريا مثل السالمونيلا *Salmonella* إلى قطع بواسطة إنزيم التحديد Restriction enzymes، ثم يتم اختيار قطعة معينة منها لتستخدم كمجس لبكتيريا *Salmonella* ولابد أن تتميز هذه القطعة بقدرتها على التهجين مع الحامض النووي DNA لجميع السلالات الأخرى من بكتيريا السالمونيلا *Salmonella* ولا تتهجن مع الحامض النووي DNA للأنواع المتقاربة معها من البكتيريا المعوية الأخرى.

الانسياب أو التدفق السيتومتري Cytometric Flow:

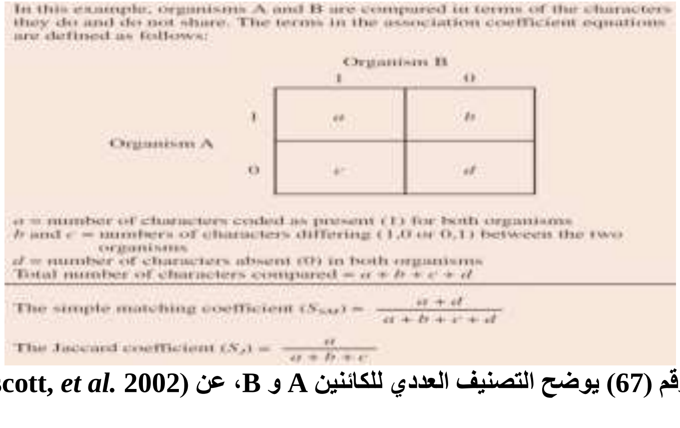
يمكن استخدام تقنية الانسياب أو التدفق السيتومتري للتعرف على نوع البكتيريا في عينة سائلة بدون عزل وزراعة البكتيريا التي توجد بها، وفى هذه الطريقة يتم دفع السائل الذي يحتوى على البكتيريا من خلال فتحة ضيقة وبواسطة قياس الاختلاف في درجة التوصيل الكهربائي Electrical conductivity بين الخلايا وبين الوسط المحيط يمكن الاستدلال على وجود البكتيريا بسهولة، وإذا ما تمت إضاءة المحلول ألذي يمر من خلال الفتحة بواسطة أشعة الليزر فإن كمية الضوء المشتت التي يتم تحليلها بواسطة الحاسب الآلي سوف تدل على حجم الخلايا وشكلها وكثافتها وطبيعة سطحها، كما يمكن استخدام تقنية التألق Fluorescence كما تسمى هذه التقنية بالاستشعاع أو التفلور (وهي عبارة عن إطلاق نور ناشئ عن امتصاص الإشعاع من مصدر أخر) للتعرف على الخلايا ذات التألق الفلوريسيني الطبيعي Naturally Fluorescent مثل بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* مع الخلايا البكتيرية الأخرى التي تمت صباغتها بواسطة صبغة فلوريسينية ويمكن توظيف مثل هذه الطريقة في التعرف على أنواع البكتيريا الممرضة Pathogenic Bacteria في الحليب الخام، حيث تستخدم تقنية الانسياب السيتومتري للتعرف على وجود بكتيريا مثل *Listeria monocytogenes* في الحليب، حيث يفضل استخدام هذه الطريقة نظرا لسرعتها واختصارها للوقت، حيث أنها لا تحتاج إلى عزل وزراعة البكتيريا للتعرف عليها، وفي هذه الطريقة يتم تعليم أجسام مضادة لبكتيريا *L. monocytogenes* بصبغة

فلوريسينية وإضافتها للحليب المراد فحصه، ثم يمرر الحليب في جهاز التدفق السيتومتري الذي يقوم بقياس الضوء الذي يتشتت من الأجسام المضادة الموسومة والمتحدة مع البكتيريا.

التصنيف العددى Numerical Taxonomy:

يستخدم التصنيف العددي للاستدلال على العلاقات التطورية (الوراثية) بين أنواع البكتيريا، حيث يتم تدوين الصفات المتعددة للبكتيريا في جدول، مثل مقدرة البكتيريا على استخدام أنواع معينة من المواد الكربوهيدراتية، أو تكوين أصباغ أو تكوين نوع معين من الأحماض، ويتم تسجيل عدد الصفات الموجبة والسالبة لكل نوع من البكتيريا كذلك يمكن تسجيل صفات تعاقب الحمض الأميني ونسبة أزواج القواعد النيتروجينية G + C ونسبة حدوث التهجين بين نوعين من سلاسل الأحماض النووية، ويجب اختيار الاختبارات بعناية كما يجب تقدير كل اختبار بدرجات متساوية، أي أنه يتم تسجيل كل اختبار موجب بقيمة 1 (واحد) والاختبار السالب بقيمة صفر، وعلى العكس مما هو مستخدم في طرق التعرف السريعة التي يتم فيها تقدير الاختبارات بدرجات نسبية. يتم بعد ذلك استعمال الحاسب الآلي لعمل تماثل Match لصفات كل نوع من البكتيريا مع صفات الأنواع الأخرى، وكلما ازدادت عدد الصفات التي يشترك فيها نوعان من البكتيريا، كلما ازداد احتمال تقاربها في الصفات التصنيفية، وعندما تصل نسبة التشابه بين نوعى البكتيريا إلى 90 % أو أكثره فغالبا ما يدل ذلك على تصنيفهما تحت نوع واحد.

ويمكن للحاسب الآلي أن يكون شجرة تصنيفية Dendrogram توضح علاقات التقارب الوراثي Phylogenetic relationships التي تم استنتاجها من التماثل الذي حدث في عملية التهجين والتجارب الوراثية الأخرى. وقد كان يستخدم فقط في السابق صفات الشكل الظاهري والأصباغ التفاضلية والاختبارات الكيموحيوية كعناصر لتعرف البكتيريا، ولكن مع تطور التقنيات أمكن استخدام تقنيات تحليل الأحماض النووية والبروتين في تعريف البكتيريا ومن ثم تصنيفها.


In this example, organisms A and B are compared in terms of the characters they do and do not share. The terms in the association coefficient equations are defined as follows:

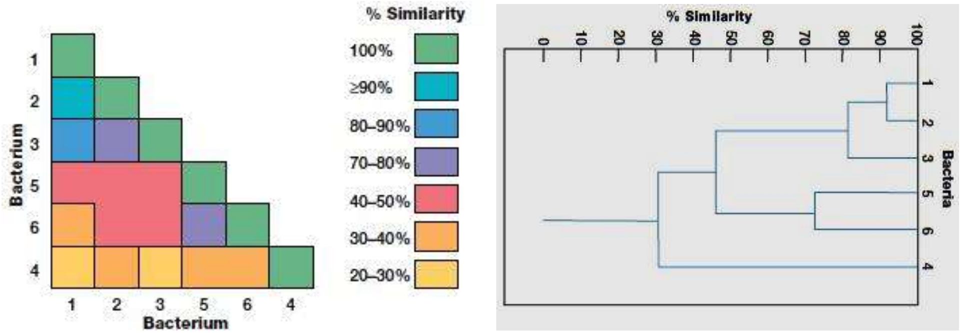
		Organism B: 1	Organism B: 0
Organism A	1	a	b
	0	c	d

a = number of characters coded as present (1) for both organisms
b and c = numbers of characters differing (1,0 or 0,1) between the two organisms
d = number of characters absent (0) in both organisms
Total number of characters compared = $a + b + c + d$

The simple matching coefficient $(S_{SM}) = \frac{a + d}{a + b + c + d}$

The Jaccard coefficient $(S_J) = \frac{a}{a + b + c}$

الشكل رقم (67) يوضح التصنيف العددي للكائنين A و B، عن (Prescott, *et al.* 2002).



الشكل رقم (68) يوضح شجرة تصنيفية **Dendrogram** وعلاقة عددية للتقارب الوراثي **Phylogenetic relationships** بين عدد من سلالات البكتيريا، عن (**Prescott, *et al.* 2002**).

وبعد أن تعرفنا على أهم الوسائل المستخدمة في تصنيف البكتيريا، سنستعرض في السطور التالية بعض التفاصيل العامة (باختصار شديد) عن أهم العائلات الأجناس والأنواع البكتيرية في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية.

أولاً: العائلة *Acetobacteraceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class I. "Alphaproteobacteria"
Order I. "Rhodospirillales"
Family II . *Acetobacteraceae*
Genus I. *Acetobacter*
Genus IX. *Gluconobacter*

في حين أنها كانت تقع ضمن القسم الرئيس Gracilicutes ضمن المجموعة الرابعة section (4) (Gram-negative Aerobic Rods and Cocci) البكتيريا الهوائية العصوية والكروية السالبة لصبغة جرام. وشكل خلايا هذه العائلة عصوي إلى بيضاوي وهي تؤكسد الكحول الإيثيلي إلى حامض الخليك في وسط متعادل أو حامضي (pH 4,5)، ومن أهم أجناس هذه العائلة الجنس *Acetobacter* والجنس *Gluconobacter*، ويمكن التفريق بين هذين الجنسين ببعض الخواص الكيميوحيوية، كما أن الجنس الأول يمتلك أسواط محيطية Peritrichous في حين أن الأخر تكون أسواطه قطبية Polar flagella. وللجنسين أهمية صناعية فعلى سبيل المثال الجنس *Acetobacter* ومن أهم أنواعه *A. aceti* subsp. *aceti* المستخدم في صناعة الخل في حين أن *A. aceti* subsp. *Xylinus* يتسبب في تكوين مواد مخاطية لزجة في الأوساط التي ينمو فيها، كما يدخل جنس *Gluconobacter* في صناعة بعض المواد الكيميائية مثل Sorbose و Dihydroxyacetone و 5- Keto gluconic acid.

ثانياً: الجنس *Brucella*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class I. "Alphaproteobacteria"
Order VI. "Rhizobiales"
Family III . *Brucellaceae*
Genus I. *Brucella*

في حين أنه كان يقع ضمن القسم الرئيس Gracilicutes ضمن المجموعة الرابعة section (4) (Gram-negative Aerobic Rods and Cocci) البكتيريا الهوائية العصوية والكروية السالبة لصبغة جرام. وأفراد هذا الجنس عصوية قصيرة بدون أسواط وهي متطفلة وممرضة للحيوانات والإنسان ، وأهم الأنواع المرتبطة بالأغذية ما يلي :-

1- *Brucella abortus*: وهذا النوع في العادة يكون ممرضاً للأبقار ويسبب حالات الإجهاض ، كما يمكن أن يكون هذا النوع ممرضاً للإنسان، غير منتج للأصباغ، يكّون دائرية ومحدبة ذات سطح ناعم لامع. موجب لأنزيم اللاأوكسيديز يختزل النترات إلى نيتريت ويحتاج عادة إلى ثاني أكسيد الكربون CO_2 (5 %) للنمو، كما أنه ينتج كبريتيد الهيدروجين H_2S. تنمو في مدى بين 20 إلى 40°م ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37°م.

2- *Brucella melitensis*: وهي عادة ممرضة للماعز والخرفان ولكن يمكن تعدي حيوانات أخرى مثل الأبقار كما أنها من الممكن أن تكون معدية للإنسان كذلك، مظهر مستعمراتها يشبه مستعمرات النوع السابق ويختزل النترات إلى نيتريت وأيضاً تنمو في مدى بين 20 إلى 40°م ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37°م.

ثالثاً: العائلة *Alcaligenaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class II. "Betaproteobacteria"
Order I. Burkholderiales
Family I. *Alcaligenaceae*
Genus I. *Alcaligenes*
Genus II. *Achromobacter*

في حين أجناس هذه العائلة كانت تصنف كأجناس تابعة للمجموعة الرابعة section (4) (Gram-negative Aerobic Rods and Cocci) البكتيريا الهوائية العصوية والكروية

السالبة لصبغة جرام الواقعة ضمن القسم الرئيس **Gracilicutes**. ويعتبر الجنس ***Alcaligenes*** من أهم أجناس هذه العائلة وأفراد هذا الجنس عصوية هوائية متحركة بأسواط محيطية، تتواجد في التربة والمياه العذبة ومياه البحار، وكذلك في القناة الهضمية للحيوانات ويمكن عزلها من البيض الفاسد، وهي تكون مستعمرات عديمة اللون، تنتج إنزيم الاوكسيديز، وتتسبب في تلف الأغذية المحفوظة بالتبريد. وتتميز (كما يستوحى من اسمها) بأنها تعطي تفاعل قلوي في وسط النمو، ومن أهم أنواعها ***Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*** و ***Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis***. في حين أن جنس ***Achromobacter*** فيتواجد في الماء أو التربة ويعود إلى المجموعة المحبة للملوحة، وكثيراً ما يصنف هذا الجنس خطأً على أساس أنه ***Pseudomonas***. ويتسبب هذا الجنس في تلف الاسماك وتكوين نمو لزج على الأغذية أحياناً. ومن أهم أنواعه ***Achromobacter obae*** المستعمل في انتاج الحامض الاميني اللايسين.

رابعاً: الجنس *Coxiella*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class III. "Gammaproteobacteria"
Order VI. "Legionellales"
Family II. *" Coxiellaceae"*
Genus I. *Coxiella*

وقد كان يقع ضمن القسم الرئيس **Gracilicutes** ضمن المجموعة التاسعة **(9) section (Rickettsias and Chlamydias)** تحت الرتبة **Rickettsiaceae** ضمن العائلة ***Rickettsiaceae***. وخلايا هذا الجنس صغيرة جداً غير متحركة سالبة الصبغة جرام متطفلة إجباراً بحيث تنمو فقط في خلايا العائل. ومن أهم الأنواع البكتيرية المنتمية لهذه المجموعة ولها علاقة بالأغذية البكتيريا المسماة ***Coxiella burnetii*** وهي البكتيريا المسببة لحمى تعرف باسم حمى كيو **(Q-fever)**. وتنمو هذه البكتيريا بشكل جيد في الفجوات العصارية لخلايا العائل في الفقاريات. والمفصليات ***Anthropods*** (وخصوصاً القراد **Tick**) تعتبر وسيطاً ناقلاً للمرض **(Q-fever)** للأبقار والخراف والماعز . والحيوانات المصابة والتي قد تبدو سليمة ظاهرياً يمكن أن تفرز البكتيريا مع حليبها. وتكون خلايا بكتيريا ***Coxiella burnetii*** عصوية الشكل أو كروية وعادة تكون بأشكال متعددة **Pleomorphic** ويتميز هذا الجنس بمقاومته الشديدة للعوامل الطبيعية و الكيميائية في البيئة الخارجية.

خامساً: الجنس *Pseudomonas*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class III. "Gammaproteobacteria"
Order IX. Pseudomonadales
Family I. *Pseudomonadaceae*
Genus I. *Pseudomonas*

في حين أنه كان يقع ضمن القسم الرئيس **Gracilicutes** ضمن المجموعة الرابعة **(4) section** البكتيريا الهوائية **(Gram-negative Aerobic Rods and Cocci)** العصوية والكروية السالبة لصبغة جرام. وتتميز أجناس هذه العائلة بأنها عصوية مستقيمة أو منحنية سالبة لصبغة جرام، متحركة بواسطة أسواط قطبية، موجبة لأنزيمي الكاتليز والاكسيديز، عضوية التغذية، وعادة تكون هوائية مجبرة عدا الأنواع التي تختزل النترات **Denitirfication** كوسيلة لتوفير الظروف اللاهوائية. وفيما يلي سرد لأهم الأنواع التي تشكل أهمية في مجال الأغذية:

1- ***Pseudomonas aeroginosa***: وهي بكتيريا رمية مصدرها التربة والماء، كما تكون مرضية انتهازية وتتواجد في الجروح والحروق والمجاري البولية كما يمكن أن تتسبب بحالات من التهاب الضرع **Mastitis** في الماشية. وهي بكتيريا هوائية إجبارية عدا في البيئة الحاوية على النترات، ومن الناحية الغذائية تتصف بالمرونة **Versatile** ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37°م.

2- ***Pseudomonas fluorescens***: وتتواجد بكثرة في الماء والتربة وهي تنتج أصباغ فلورنسيية قابلة للانتشار، وتكون هذه البكتيريا مرتبطة بفساد الأغذية المحفوظة بالتبريد وترتبط بفساد الحليب ومنتجاته بسبب قدرتها على النمو في درجات حرارة منخفضة حيث تعتبر متحملة لدرجات الحرارة المنخفضة **Psychrotrophic** وهي متنوعة التغذية، هوائية إجبارية عدا سلالات قليلة تستطيع إستخدام النترات كمستقبل نهائي للإكترونات. ودرجة الحرارة المثلى لها تتراوح بين 25-30°م وهي تنمو عند 4°م ولكنها لا تنمو عند 42°م.

3- من الأنواع الأخرى التي تتبع هذا الجنس وتشكل أهمية في مجال الأغذية كلا من:

Ps. ptida, Ps. maltophilia, Ps. fragi, Ps. putrefaciens

وتتميز هذه الأنواع بأنها متحملة للبرودة **Psychrotrophic** ويمكن أن تنمو عند 4°م ولكنها لا تنمو عند 42°م وقد عزلت معظم هذه الأنواع من الماء والتربة.

سادساً: الجنس *Vibrio*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class III. "Gammaproteobacteria"
Order XI. "Vibrionales"
Family I. *Vibrionaceae*

وقد كان يقع ضمن القسم الرئيس **Gracilicutes** ضمن المجموعة الخامسة **section (5) (Facultative Anaerobic Gram-negative Rods)** البكتيريا اللاهوائية الاختيارية العصوية السالبة لصبغة جرام. فقد تم عزل أنواع تابعة للجنس ***Vibrio*** من عينات من الزبد والأغذية البحرية، وجميع أنواع هذه الجنس تكون عصوية الشكل مستقيمة أو منحنية متحركة باسواط قطبية، هوائية ولا هوائية اختيارية ، عضوية التغذية، موجبة الإنزيم الأوكسيديز محبة للحرارة المتوسطة كما أنها يمكن أن تكون متحملة لدرجة الحرارة المنخفضة **Psychrotrophic** سالبة لصبغة جرام. ومن الأنواع المهمة لهذا الجنس ***Vibrio cholerae***. وتسبب هذه البكتيريا الإصابة بمرض الكوليرا وهو عبارة عن التهاب بكتيري حاد يصيب الجهاز الهضمي وخصوصاً الأمعاء الدقيقة ويتميز بإسهال حاد ومتكرر وقيء مع آلام وجفاف في الجسم وهذه البكتيريا حساسة للعصارة المعدية، لهذا من لديهم قلة في العصارة يكونون معرضين أكثر من غيرهم، ومن الملاحظ أن الأشخاص الذين يعيشون في المناطق الموبوءة بهذا المرض يكون لديهم تعود تدريجي ويكتسبون مناعة طبيعية. إن طريقة العدوى للكوليرا هو عن طريق الفم ، وذلك بشرب السوائل أو أكل المأكولات الملوثة بهذه البكتيريا. وبكتيريا ***V. cholerae*** عصوية الشكل ملتوية قليلاً (واوية الشكل)، سالبة التصبيغ بصبغة جرام، متحركة ولها سوط واحد في نهاية الخلية، لاهوائية اختيارية، تنمو على الآجار المغذي وتكون مستعمراتها لامعة وشكلها غير منتظم، وتنمو البكتيريا عند **pH** يتراوح بين **6.0 – 9.6** والـ **pH** المثالي لنموها هو **7.6 – 8.6**. وتنمو عند نسبة من الـ **NaCl** تتراوح بين صفر – **6%**. وتتراوح درجات حرارة نموها بين **15 - 45**°م وتكون درجة الحرارة المثلى لنموها بين **30 - 35**°م. كذلك هناك أنواع أُخرى هامه مثل النوعين ***V. parahaemolyticus*** و ***V. vulnificus*** حيث تسبب هذه الأنواع البكتيرية ثلاثة أنواع من الأمراض تتمثل في الإسهال، الإصابة الجلدية، وتسمم الدم **Septicemia or blood poisoning**، الإسهال الناتج من البكتيريا ***V. parahaemolyticus*** نسبيا غير ضار، بينما الإسهال الناتج من ***V. vulnificus*** نادر الحصول وإن حصل فإنه يسبب أيضاً تسمم الدم والوفاة في معظم الحالات.

سابعاً: العائلة *Enterobacteriaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class III. "Gammaproteobacteria"
Order XIII. "Enterobacteriales"
Family I. Enterobacteriaceae

وهذه العائلة تضم العديد من الأجناس غالبيتها تشكل أهمية في مجال الأغذية ومن أهمها ما يلي:

Genus I. Escherichia
Genus X. Citrobacter
Genus XII. Enterobacter
Genus XIII. Erwinia
Genus XVI. Klebsiella
Genus XXVIII. Proteus
Genus XXXII. Salmonella
Genus XXXIV. Shigella
Genus XL. Yersinia

في حين كانت هذه العائلة تقع ضمن القسم الرئيس **Gracilicutes** ضمن المجموعة الخامسة **(5) section (Facultative Anaerobic Gram-negative Rods)** البكتيريا اللاهوائية الاختيارية العصوية السالبة لصبغة جرام. من أهم الخصائص العامة لها أن خلاياها عادة عصوية الشكل مستقيمة وصغيرة وتكون الخلايا في العادة منفردة يمكن أن تكون كبسولة **Capsulated**، والخلايا متحركة بواسطة أسواط محيطية أو قد تكون غير متحركة، سالبة لصبغة جرام، هوائية ولا هوائية اختيارية، عضوية التغذية ودرجة حرارة النمو المثالي لغالبية الأنواع 37°م. أما بالنسبة لأهم أجناس هذه العائلة ذات العلاقة بميكروبيولوجيا الأغذية فهي كما يلي :-

1- الجنس *Escherichia*:

يحتوي على العديد من الأنـــــــواع (*Escherichia coli, E. adecarboxylata, E. albertii, E. blattae, E. fergusonii, E. hermannii. E. vulneris*)، لكن أشهر أنواع هذا الجنس هو *Escherichia coli* الذي يتواجد هذا النوع في الجزء السفلي من الأمعاء الدقيقة للإنسان والحيوانات ذات الدم الحار كجزء من المجموعة البكتيرية الطبيعية **(Microflora)**، ويعتبر هذا النوع أحد أنواع بكتيريا القولون **Coliform Bacteria**، والتي تعرف على أنها بكتيريا سالبة لتصبيغ جرام سالبة الإنزيم الاوكسيديز، عصوية غير متجرثمة يمكن أن تنمو هوائياً على بيئة أجار تحتوي على أملاح الصفراء ، تخمر اللاكتوز خلال 48 ساعة عند 37°م مع إنتاج الحمض والغاز وإضافة إلى الـ *E. coli* تشمل مجموعة بكتيريا القولون

أنواع أخرى تنتمي لأجناس عديدة تتبع العائلة *Enterobacteriaceae* مثل *Enterobacter*، *Citrobacter* وغيرها من الأجناس الأخرى. ويمكن تمييز بكتيريا *E. coli* بأنها يمكن أن تنمو عند درجة حرارة 37°م وكذلك 44.5°م في حين أن الأنواع الأخرى من بكتيريا القولون تنمو عند درجة حرارة 37°م ولكنها لا تنمو عند حرارة 44.5°م.

وبعض سلالات الـ *E. coli* تنتج مركبات تسمى **Colicin** كما أن بعض السلالات يمكن أن تكون ممرضة إنتهازية **Opportunistic pathogens** فهناك بعض السلالات التي تسبب التهاب الضرع الحاد في الماشية، ووجود هذه البكتيريا في الأغذية أو الماء دلالة على تلوث من مصدر برازي **Fecal sours**.

2- الجنس *Citrobacter*:

ويتميز بأن خلاياه عصوية متحركة بواسطة أسواط محيطة **Peritrichous**، تستهلك السترات كمصدر وحيد للكربون وتخمر اللاكتوز ويمكن أن تتواجد في منتجات الألبان، وأنواع هذا الجنس تعتبر ضمن مجموعة بكتيريا القولون **Coliform Bacteria** التي تستخدم كميكروبات داله كما أنها تتسبب في فساد منتجات الأغذية .

3- الجنس *Enterobacter*:

وقد كان يسمي سابقاً *Aerobacter*، وأنواع هذا الجنس عصوية غير متحركة تتواجد منفردة أو في سلاسل قصيرة، متحركة بواسطة الاسواط المحيطة **Peritrichous** وتتواجد هذه الأنواع في التربة والماء والمجاري وأمعاء الإنسان والحيوان ويمكن أن تلوث الحليب وبعض السلالات في هذا الجنس والمكونة للكبسولة تكون لها القدرة على إحداث اللزوجة في الحليب وبعض الأغذية وأيضاً يعتبر هذا الجنس ضمن مجموعة بكتيريا القولون.

4- الجنس *Klebsiella*:

وخلايا هذا الجنس عصوية غير متحركة تتواجد منفردة أو في سلاسل قصيرة، والكثير من أنواع هذا الجنس تكون كبسولة، وتتواجد في الماء والمجاري والتربة وهي جزء من فلورا الفم والبلعوم والقناة المعوية، وبعض أنواع هذا الجنس قد تسبب أمراض للإنسان مثل الإلتهاب الرئوي وإصابات القناة التنفسية. وهذا الجنس يعتبر ضمن مجموعة بكتيريا القولون.

5- الجنس *Salmonella*:

يوجد حوالي 2400 طراز سريولوجي تابع لهذا الجنس (**2400 Serotype**) صنفت حسب طريقه **Kauffman-White** التي استعمل فيها أحرف أبجدية هي (**O**) لتدل على الانتيجين الرئيسي و (**VI**) لتدل على قابليتها لإحداث المرض **Virulence** و (**H**) لتدل على الانتيجين السوطي. وكل أنواع هذا الجنس تعتبر مرضية للإنسان والحيوان بسبب إنتاج السم الداخلي **Endotoxin** والمرض يمكن أن يأخذ شكل الحمى المعوية **Enteric fever** كما هو

الحال بالنسبة لبكتيريا *Salmonella typhi* أو كنزلة معوية Enteritis وهو الشكل الشائع كما هو الحال بالنسبة لـــ *Salmonella typhimurium*.

6- الجنس *Shigella*:

وخصائص الأنواع التابعة لهذا النوع مقاربة لخصائص بكتيريا *Escherichia*، وكل أنواع هذا الجنس تعتبر ممرضة وتسبب حالات الزحار الباسيللي في الإنسان.

وهناك أنواع أخرى ضمن هذه العائلة مثل *Yersinia* التي أهمها اليرسنيية المعوية القولونية *Yersinia enterocolitica* التي أمكن عزلها من الماشية وكذلك الأغذية ذات الأصل الحيواني مثل الحليب والجبن والمثلجات اللبنية Ice-Cream. وقد أمكن عزلها من ماء البحيرات والآبار والأنهار أيضا. تؤدي البكتيريا إلى الالتهابات المعوية والتهاب العقد الليمفاوية المعوية والتهاب القولون، وكذلك *Proteus* و*Serratia* وغيرها تشكل أهمية في مجال الأغذية كونها تسبب فساد لبعض أنواع الأغذية.

<u>ثامناً</u>: الجنس *Campylobacter*:

Domain "Bacteria
Phylum BXII. Proteobacteria
Class V. "Epsilonproteobacteria"
Order I. "Campylobacterales"
Family I. *Campylobacteraceae*
Genus I. *Campylobacter*

وقد كان يقع ضمن القسم الرئيس Gracilicutes ضمن المجموعة الثانية section (2) Aerobic/Microaerophilic, Motile, Helical/Vibrioid Gram-negative (Bacteria) البكتيريا الهوائية / المحبة للهواء القليل ، المتحركة الحلزونية / الواوية الشكل السالبة لصبغة جرام. وضمن عائلة *Campylobacteraceae* يوجد جنس واحد فقط يشكل أهمية في مجال الأغذية هو الجنس *Campylobacter*، بعض الأنواع المنتمية لهذا الجنس تكون ممرضة للإنسان والحيوان ويمكن أن تسبب الإجهاض والعقم في الأبقار والخراف. ويتصف جنس *Campylobacter* بأن خلاياه تكون عصوية حلزونية منحنية ذات حركة لولبية مثل حركة ثاقب الفلين بواسطة سوط طرفي مفرد على أحد نهايتين أو على كل من نهايتي الخلية. وهي هوائية طفيفة (محبة للهواء القليل Microaerophilic)، عضوية التغذية سالبة لصبغة جرام.

ومن أهم أنواع هذا الجنس المنثنية الصائمية *Campylobacter jejuni* والمنثية الجنينية *C. fetus* التي تسبب الإجهاض أو العقم في الماشية والأغنام، والنزلات المعوية والإسهال في الإنسان وتسبب التهاب الضرع في الأبقار أيضا. و لقد سجلت عدة تفشيات لالتهاب الأمعاء (Enteritis) سببها بكتيريا المنثية *Campylobacter* نتيجة تناول الحليب الطازج.

تاسعاً: العائلة *Clostridiaceae*: تقع في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class I. "Clostridia"
Order I. "Clostridiales"
Family I. *Clostridiaceae*

في حين كانت تقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes ضمن المجموعة الثالثة عشر section (13) (Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci) البكتيريا العصوية والكروية، الموجبة لصبغة جرام والمكونة للأبواغ. وقد كان ضمن هذه المجموعة يقع عدد الأجناس مثل (*Bacillus, Sporolactobacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina, Oscillospira*) إلا أن الطبعة الثانية قد وضعت كل جنس من هذه الأجناس ضمن عائلة مستقلة و حتى في أصناف ورتب مختلفة، وبالنسبة للعائلة *Clostridiaceae* فإن أهم أجناسها التي تشكل أهمية كبرى في مجال الأغذية هو الجنس *Clostridium*. توجد هذه ميكروبات هذا الجنس في التربة وفي القناة الهضمية للإنسان والحيوانات. وتصل للأغذية عبر المخلفات الحيوانية والآدمية والتربة والأعلاف. ولأن معظم السلالات لاهوائية إجبارية ، فهي تشكل أهمية كبرى في صناعة الأغذية المعلبة وبعض منتجات الألبان مثل الجبن والحليب المبخر المعلب والمكثف المحلى والمركز المعلب، ومن أهم أنواع هذا الجنس *C. thermobutyricum* الذي عزل من الحليب المعقم، ونظرا لأنه محب للحرارة ولا هوائي فإنه يحتمل فقط أن ينمو ويسبب فساد تحت ظروف غير عادية. مستعمراته تكون سطحية دائرية منخفضة ومستوية ذات مركز مرتفع، وشفافة رمادية اللون بسطح لامع، تحت المجهر تبدو أبواغه طرفية، لا يسبب تحلل الجلاتين مائياً، يخمر اللاكتوز مسبباً تخثر للحليب، ودرجة حرارة نموه المثلى هي 55°م، والنوع *C. thermosaccharolyticum* الذي يتسبب في فساد كثير من الأغذية المحفوظة بالتعليب، وهنالك أنواع أخرى مثل *C. butyricum* و *C. tyrobutyricum* و *C. sporogenes* والتي لها أدوار مهمة في فساد بعض الأغذية وخصوصاً المعلبة. كما أن هناك النوع *C. botulinum* المسبب لحالات التسمم الغذائي المسمى التسمم البوتشليني Botulism والذي يكون سببه وجود سموم في الغذاء مفرزة بواسطة هذه البكتيريا.

عاشراً: العائلة *Bacillaceae*: تقع في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. " Bacilli"
Order I. "Bacillales"
Family I. *Bacillaceae*

وهي أيضاً كسابقتها كانت تقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes ضمن المجموعة الثالثة عشر (Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci) section (13) ويعد الجنس *Bacillus* أهم أجناس هذه العائلة وأكثرها ارتباطاً بفساد منتجات الأغذية، ومن خصائص العائلة أن خلاياها تكون عصوية مستقيمة كبيرة نوعاً ما ويمكن أن تكون على شكل فردي أو في سلاسل، وتنتج أبواغ داخلية Endospores مقاومة للحرارة والعوامل الأخرى. متحركة بأسواط جانبية أو محيطة وقد تكون غير متحركة موجبة لصبغة جرام ما عدا في الأطوار المتأخرة من النمو، هوائية أو لا هوائية اختيارية، عضوية التغذية. ومن أهم الأنواع لهذا الجنس والتي لها علاقة بالحليب ومنتجاته *B. cereus* حيث يعتبر هذا النوع مهماً في صناعة الأغذية والألبان لسببين رئيسيين الأول هو إنتاجه للسموم حيث ثبت أنه الميكروب المسبب للتسمم الغذائي المرتبط بتناول بعض المنتجات اللبنية الغنية في محتواها من النشا و السكريات مثل الأرز بالحليب وحلوى الكاسترد وغيرها، حيث تنتج السلالات المسببة للتسمم الغذائي السموم التالية:

β-lactamase، Hemolysin، Proteases، Lecithinase، Cereolysin ، وهي سموم خلوية، بالإضافة إلى سم معوي مسبب للقيء وسم معوي مسبب للإسهال، لكن الأعداد المطلوبة لحدوث التسمم في هذه الحالة يزيد عن 10^6/جم وبالتالي فإن ذلك لا يشكل مشكلة في صناعة الأغذية لوجودها عادة بأعداد منخفضة تقل كثيراً عن هذا المستوى.

أما السبب الثاني فيتمثل في إنتاج هذا النوع لإنزيم محلل للبروتين وكذلك إنزيم محلل للفوسفوليبيدات إضافة إلى إنتاجه للأبواغ المقاومة للحرارة ويترتب على ذلك التجبن الحلو في الحليب المبستر وكذلك تسبب أبواغ *B. cereus* المقاومة للحرارة العالية جداً فساد الحليب المعامل بالحرارة الفائقة (UHT-Milk) وقد وجد أن لبكتريا *B. cereus* علاقة ببعض عيوب الحليب ، مثل النكهة غير المرغوبة، التخثر الحلو والقشدة المرة المتكونتين بفعل الإنزيمات المحللة للبروتين. إن الجمع بين خاصيتي المقاومة للحرارة وتفضيل البيئة الباردة يمثل سبباً مهماً لبكتريا *B. cereus* ليجعلها من أهم الأسباب المسببة لفساد المنتجات اللبنية. أيضاً هناك أنواع مثل *B. subtilis* والتي تتسبب في فساد بعض الأغذية كما يمكن أيضاً أن تتسبب في إحداث اللزوجة في الحليب الخام والمبستر فقد عرف عنها أنها مسببة للتجبن الحلو في الحليب، كذلك هناك أنواع أخرى لا تقل أهمية مثل *B. stearothermophilus* والذي قد يتسبب بفساد الأغذية المعلبة وكذلك تلف منتجات الحليب المبخر المعلب والمكثف المحلى والمركز المعلب مثله في ذلك مثل *B. coagulans* الذي مصدره ربما يكون الأعلاف المقدمة كعليقه للحيوان.

أحدى عشر: الجنس *Listeria*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. " Bacilli"
Order I. "Bacillales"
Family IV. *"Listeriaceae"*
Genus I. *Listeria*

في حين أنه كان يعتبر من الأجناس غير المؤكدة التابعة للعائلة *Lactobacillaceae* والتي كانت تقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الرابعة عشر section (14) (Regular, Nonsporing, Gram-positive Rods) البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة جرام المنتظمة غير المكونة للأبواغ، و أهم ما يميز هذا الجنس أن خلاياه عصوية الشكل قصيرة موجبة لصبغة جرام لها القدرة على النمو في درجات حرارة تتراوح بين 2-42°م، وتحتاج للقليل من الهواء وتنمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني pH بين (5.6 - 9.8) موجبة لإختبار الكاتليز ومن أهم الأمثلة عليها *Listeria monocytogenes* التي تعتبر ممرضة للإنسان والأبقار وتسبب إجهاض للأبقار وهي تُحدث درجات متفاوتة من التحلل للدم من نوع بيتا (*β*-haemolysis) حيث يعتمد ذلك على سلاله الميكروب ونوع الدم. ولقد تم عزل البكتيريا من الحليب والجبن غير المبستر كما تم عزله من التربة والروث والعلف المحفوظ (Sialge)، وتؤدى البكتيريا إلى الإجهاض المتكرر عند المرآة الحامل و قد يحدث التهاب السحايا والمخ وتضخم العقد اللمفية، وتنتشر عن طريق اللّحوم ومنتجاتها وكذلك بعض منتجات الألبان.

اثني عشر: الجنس *Staphylococcus*:

يقع هذا الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. " Bacilli"
Order I. "Bacillales"
Family V. "Staphylococcaceae"
Genus I. *Staphylococcus*

في حين أنه كان يقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الثانية عشر section (12) (Gram-positive Cocci) البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة جرام. ومن أهم أنواع هذا الجنس *Staphylococcus aureus subspecies aureus* وهي بكتيريا موجبة لصبغة جرام، و تتجمع على هيئة عناقيد العنب ولهذا تُسمى بالمكورات العنقودية. تنمو هوائياً

وهي أيضاً لا هوائية اختيارية، غير متحركة وغير مكونة للجراثيم وتُفرز إنزيم الكاتاليز. و تظهر مستعمراتها باللون الذهبي عـادة ولكن يتفاوت لون الصبغة بين اللون البرتقالي والأبيض. كما يحتوي عدد كبير من سلالات المكورات العنقودية الذهبية على محفظة يمكن أن تقسم على أساسها إلى ثمانية أنواع سيرولوجية (capsular serotypes 8). تخمر العديد من السكريات منتجة حمض دون أن تطلق غازاً وتفرز إنزيم الكاتاليز catalase وتميع الهلام liquefy gelatin وهي تحلل الدم عند نموها على بيئة أجار الدم (دم الأرنب أو الخروف). كما تنمو هذه البكتيريا على وسط غذائي يحتوي على 15% من كلوريد الصوديوم وهو وسط لا تنمو عليه البكتيريا السالبة لصبغة جرام وبعض البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بسبب تركيزه الملحي العالي. وتستغل هذه الخاصية في عزل هذه البكتيريا بين خليط من الأنواع المختلفة. تفرز هذه البكتيريا كثيراً من السموم من بينها السم المعوي Enterotoxin وهو من السموم الخارجية التي تفرزها البكتيريا في الوسط الذي تنمو فيه، ذو طبيعة بروتينية، مقاوم للحرارة وإنزيمات الجهاز الهضمي. يسبب السم المعوي تسمماً غذائياً يظهر على هيئة إسهال شديد وقيء، وُيفرز من قبل عدد كبير من المكورات العنقودية الذهبية في الطعام الملوث بها كالحلويات والمعجنات ومشتقات الألبان والمايونيز واللّحوم الملوثة. وهناك ـ حتى الآن ـ سبعة أنواع مصلية لهذا السم.

ثلاثة عشر: العائلة *Lactobacillaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. "Bacilli"
Order II. "Lactobacillales"
Family I. *Lactobacillaceae*

والعائلة *Lactobacillaceae* كما أشرت سابقاً كانت تقع في الطبعة الأولى من دليل برجي ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الرابعة عشر (14) section البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة (Regular, Nonsporing, Gram-positive Rods) جرام المنتظمة غير المكونة للأبواغ، وهناك ثلاثة أجناس تنضوي تحت هذه العائلة إلا أن أهمها على الإطلاق في مجال ميكروبيولوجيا الألبان هو جنس *Lactobacillus*. خلايا هذا الجنس عصوية طويلة موجبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ وعادة ما تتواجد على شكل سلاسل طويلة وتفضل كمية قليلة من الهواء (Microaerophilic) وبعضها لاهوائي، تتواجد عادة في النباتات أو منتجات الألبان وتكمن أهمية هذا الجنس في الحليب ومنتجات الألبان إلى:

1- عدم قابليتها على تكوين معظم الفيتامينات التي تحتاجها وبالتالي عدم مقدرتها على النمو إلا في الأغذية الغنية بالفيتامينات كالحليب ومنتجاته.

2- قابليتها على تخمر السكريات منتجة حامض اللاكتيك وبالتالي يمكن استخدامها في إنتاج المنتجات اللبنية المتخمرة، وكأمثلة على الأنواع التي يمكن استخدامها في هذا المجال ما يلي: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* وكانت تعرف قديماً باسم (*L. bulgaricus*) و *L. acidophilus* و *L. casei subspecies casei* وغيرها.

3- إنتاج الغازات والمركبات الطيارة وبالتالي تؤدي إلى تلف بعض منتجات الألبان مثل الجبن السويسري وجبن التشيدر.

4- قابلية بعض أنواعها على مقاومة حرارة البسترة (Thermoduric).

ومن خلال قابليتها على تخمير السكريات يمكن أن تقسم إلى مجموعتين هما:

1- متجانسة التخمر (Homofermentative): وتشمل الأنواع التي تنتج أساساً حامض اللاكتيك ومن أمثلتها ما يلي: *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* و *L. lactis* وكذلك *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* وغيرها.

2- متباينة التخمر (Heterofermentative): وتشمل الأنواع التي تنتج إضافة إلى حامض اللاكتيك مركبات أُخرى كحامض الخليك و CO_2 والكحول الإيثيلي ومركبات أُخرى ويعتبر النوع *L. fermentum* والنوع *L. brevis* مثالاً لهذه المجموعة.

<u>أربعة عشر</u>: العائلة *Enterococcaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. "Bacilli"
Order II. "Lactobacillales"
Family I V. *"Enterococcaceae"*

وقد كانت تقع في الطبعة الأولى ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الثانية عشر (12) section (Gram-positive Cocci)، وقد كانت تتبع الجنس *Streptococcus* والذي كان قد قسم إلى أربع مجموعات احتلت المكورات المعوية *Enterococcus* المجموعة الرابعة منها، أما حالياً فقد وضعت ضمن عائلة مستقلة، والجنس الرئيس فيها هو *Enterococcus* و من أهم أنواعه *E. faecalis* وكان يسمى *S. faecalis* و *E. faecium* وكان يسمى *S. faecium* وغيرها من الأنواع التي تسبب تحلل الدم من نوع بيتا (*β*) والتي يمكن أن تنمو عند درجتي حرارة 10 و 45°م. ويمكن تمييز النوع الأول *E. faecalis* عن النوع الثاني من خلال مقاومته الحرارية ومصدره البشري بينما يعتبر النوع الثاني *E. faecium* نباتي المصدر. وتسبب هذه الأنواع تغيرات كثيرة من حموضة الحليب أو الطعم غير المرغوب في منتجات الألبان و تتميز الأنواع هذه بالمواصفات التالية:

1- مقاومتها لدرجة حرارة البسترة.

2- مقاومتها لنسب عالية من الملح تصل إلى 5- 6 % أو أكثر.

3- مقاومتها للمحيط القاعدي العالي ولغاية pH 9.6.

4- إمكانيتها النمو ضمن مدى واسع من درجات الحرارة يمتد بين 5-8°م ولغاية 48-50°م.

خمسة عشر: العائلة *Leuconostocaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. "Bacilli"
Order II. "Lactobacillales"
Family V. "Leuconostocaceae"

والعائلة *Leuconostocaceae* أيضا كانت تقع في الطبعة الأولى من دليل برجي ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الثانية عشر (12) (Gram-positive Cocci) البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة جرام، وأهم أجناس هذه العائلة هو الجنس *Leuconostoc* والذي تتميز خلاياه بكونها مكورة أو بيضاوية، موجبة لصبغة جرام وسالبة لإنزيم الكاتاليز وبكونها متباينة التخمر Heterofermentative وعادة ما يكون مصدرها نباتي، وتكمن أهميتها في منتجات الألبان في قابليتها على تخمر حامض الستريك لإنتاج مواد ذات روائح مميزة مثل ثنائي المثيل Diacetayl والأسيتوين Acetoin والبيوتان دايول 2,3 Butanediol ولذلك تسمى بادئات النكهة، ونظراً لذلك ولقابليتها على تشجيع نمو الأنواع البكتيرية من جنس *Lactobacillus* فإنها تستعمل بصورة شائعة كبوادي لحليب الخض والزبد والجبن. ومن أمثلها *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* و *L. mesenteroides subsp. cremoris* وأيضاً *L. mesenteroides subsp. dextranicum* ومن أهم صفاتها قابليتها على تحمل التراكيز العالية من السكر (55- 60 %) وإنتاجها لغاز ثاني أكسيد الكربون والذي يسبب حصول الفتحات Openness في بعض أنوع الجبن، كما يسبب هذا النوع الأخير الكثير من المشاكل في صناعة السكر. ودرجة الحرارة المثلى لنمو هذه الأنواع هي بين 25-30°م.

ستة عشر: العائلة *Streptococcaceae*:

تقع هذه العائلة في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIII. Firmicutes"
Class III. "Bacilli"
Order II. "Lactobacillales"
Family VI. "Streptococcaceae"

والعائلة *Streptococcaceae* كما أشرتُ سابقاً كانت تقع في الطبعة الأولى ضمن القسم Firmicutes في المجموعة الثانية عشر (Gram-positive Cocci) section (12) البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة جرام، ضمن الجنس *Streptococcus* والذي كان قد قسم إلى أربع مجموعات منها مجموعة المكورات السبحية القيحية و مجموعة المكورات السبحية اللبنية و مجموعة المكورات السبحية Viridans المجموعة الرابعة التي تم ذكرها سابقاً، أما حالياً فقد وضعت ضمن عائلة مستقلة، وتشمل هذه العائلة جنسين الأول *Streptococcus* والثاني *Lactococcus* وكلا الجنسين يشكلان أهمية كبيرة في مجال ميكروبيولوجيا الألبان ومنتجاتها.

يتميز جنس الـ *Streptococcus* بأنه بكتيريا كروية الشكل، موجبة لصبغة جرام، هوائية، بعضها يحتاج CO_2 لتحسين النمو، غير متجرثمة غير متحركة عدا بعض الأنواع غير الممرضة. سالبة لإنزيم الكاتاليز، تخمر الجلوكوز وتنتج حامض اللاكتيك، بعضها ممرضة للإنسان والحيوان وتوجد أنواع مترممة. من أهم أنواعه *Streptococcus pyogenes* وهي عبارة عن مكورات بقطر من 0.5 - 1 ميكرون تتجمع في سلاسل قصيرة في العينات المرضية وطويلة في البيئة السائلة. تنمو على أجار الدم محللة تحليل بيتا، وتكون مستعمراتها صغيرة لامعة (1مم). تحتوي على محفظة من حمض الهيالورونيك ولا تحث الجسم على تكوين أجسام مضادة. وهي حساسة للبسيتراسين، تتمكن من النمو في بيئة تحتوي 1 ملجم من صبغة الكريستال البنفسجي، تحتاج 10% CO_2 لتحسين النمو. وهي تسبب العديد من الحالات المرضية منها:

أ- الأمراض المقيحة: وهي إما سطحية: مثل الإلتهابات الجلدية، التهاب اللوز، التهاب الأنسجة الضامة، التهاب الجيوب الأنفية. أو جهازيه: مثل تسمم الدم – التهاب السحايا – التهاب رئوي – الحمى القرمزية – حمى النفاس.

ب- غير المقيحة: وتكون من مضاعفات العدوى بالمكورات العقدية المقيحة مثل الحمى الروماتزمية Rheumatic fever و التهاب كبيبات الكلى Glomerulonephritis.

وهناك أيضاً نوع لا يقل أهمية عن النوع السابق لكنه غير ممرض وهو *Streptococcus salivarius subspecies thermophilus* ويدخل هذا النوع كبادئ في صناعة الزبادي وبعض الألبان المتخمرة.

أما في ما يخص الجنس *Lactococcus* والذي سابقاً كان يتبع مجموعة المكورات السبحية اللبنية (Lactic Streptococci) فيعتبر من أكثر الأجناس أهميه بالنسبة لمنتجات الألبان فهي تدخل كبادئات في صناعة الجبن والألبان المتخمرة، وخلايا هذه الأجناس تكون كروية أو بيضاوية وتنتظم في أزواج أو رباعيات أو سلاسل مختلفة الأطوال، موجبة لصبغة جرام ونادراً ما تكون متحركة ، وعضوية التغذية وهي لا هوائية اختيارية.

ومن أهم أنـــواع هذا الجنس مــــــا يلي: *Lactococcus lactis subspecies lactis* و *L. lactis subspecies cremoris* و *L. lactis subspecies diacetilactis* وغيرها.

سبعة عشر: الجنس *Micrococcus*:

يقع هذه الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIV. Actinobacteria
Class I. Actinobacteria
SubclassV. Actinobacteridae
Order I. Actinomycetales
Suborder VI. Micrococcineae
Family I. Micrococcaceae
Genus I. *Micrococcus*

في حين أنه كان يقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الثانية عشر (12) section (Gram-positive Cocci) البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة جرام، ضمن العائلة *Micrococcaceae* والتي كانت تضم إلى جانبه الجنس *Staphylococcus*.

وتتميز خلايا هذه الجنس بأنها كروية الشكل موجبة لصبغة جرام وعاده ما تكون غير متحركة موجبة الإنزيم الكاتليز، عضوية التغذية هوائية أو لا هوائية اختيارية، ويتميز الجنس *Micrococcus* بعدم قدرته على تخمير الجلوكوز. ويعتبر هذا الجنس إضافة إلى أجناس أُخرى من الفلورا الطبيعية لضرع الحيوانات اللبونة ولذا فإنه قد يتواجد في الحليب الخام وبعض أنواعه تمتاز بمقاومتها لدرجات الحرارة العالية Thermoduric.

ثمانية عشر: الجنس *Corynebacterium*:

يقع هذه الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIV. Actinobacteria
Class I. Actinobacteria
SubclassV. Actinobacteridae
Order I. Actinomycetales
Suborder VII. Corynebacterineae
Family I. Corynebacteriaceae
Genus I. *Corynebacterium*

وقد كان هذا الجنس يقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الخامسة عشر (15) section (Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods)، ومن أهم أنواع هذا الجنس *Corynebacterium diphtheriae* وأيضاً *C. bovis* وهي أنواع ممرضة تنتج سموماً تفرز خارج الخلايا Exotoxins وخصوصاً النوع الأول الذي يتسبب بمرض الخُناق

diphtheria للإنسان في حين أن الأخير يمكن أن يوجد بصوره متعايشة على ضرع الأبقار لكن يعتقد بأنه من الممكن أن يؤدي إلى التهاب الضرع كما يؤدي إلى ظهور حالة التزنخ في القشدة، والخصائص العامة لهذا الجنس أن خلاياه تكون عصوية مستقيمة إلى منحنية، تظهر أحياناً منتفخة بشكل الهراوة، غير متحركة في الغالب، هوائية ولاهوائية اختيارية.

تسعة عشر: الجنس *Mycobacterium*:

يقع هذه الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIV. Actinobacteria
Class I. Actinobacteria
SubclassV. Actinobacteridae
Order I. Actinomycetales
Suborder VII. Corynebacterineae
Family IV. Mycobacteriaceae
Genus I. *Mycobacterium*

في حين أنه كان يقع ضمن القسم الرئيسي Firmicutes في المجموعة السادسة عشر (16) section (Mycobacteria)، وتختلف أنواعه في الشكل من كرويه إلى خيطية طويلة حسب السلالة والوسط الغذائي المستخدم للزرع والاختبار التقليدي للتعرف على هذا الجنس هو المقدرة على مقاومة إزالة الصبغة بالحامض Acid fastness، ومن أهم أنواع هذا الجنس *Mycobacterium tuberculosis subsp. tuberculosis* المسبب للسل في الإنسان وهو غير ممرض للحيوانات وينمو عند 37°م، و *Mycobacterium bovis subsp. bovis* وهو يسبب السل في الأبقار والإنسان والخنازير ولكنة غير ممرض لمعظم الدواجن.

عشرون: الجنس *Propionibacterium*:

يقع هذه الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIV. Actinobacteria
Class I. Actinobacteria
Order I. Actinomycetales
Suborder IX. Propionibacterineae
Family I. Propionibacteriaceae
Genus I. *Propionibacterium*

وقد كان هذا الجنس يقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الخامسة عشر (15) section (Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods) البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة جرام غير منتظمة الشكل غير المكونة للأبواغ، وتعتبر أنواع هذا الجنس

مهمة في صناعة الجبن السويسري ومن أهمها *P. freudenreichii subsp. shermanii* الذي يستخدم كبادئ في صناعة الجبن السويسري حيث ينتج حامض البروبيونيك و حامض الخليك وغاز CO_2 المسبب لظهور الثقوب المميزة لهذا النوع من الجبن، وينمو هذا النوع لاهوائياً بمدى من درجات الحرارة تتراوح بين 15-45°م والمثلى 30°م.

<u>واحد وعشرون</u>: الجنس *Bifidobacterium*:

يقع هذه الجنس في الطبعة الثانية من دليل برجي كالتالي:

Domain "Bacteria
Phylum BXIV. Actinobacteria
Class I. Actinobacteria
Order II. Bifidobacteriales
Family I. *Bifidobacteriaceae*
Genus I. *Bifidobacterium*

في حين أنه أيضاً كان يقع ضمن القسم الرئيس Firmicutes في المجموعة الخامسة عشر (Irregular, Nonsporing, Gram-positive Rods)، والأنواع التابعة لهذا الجنس تتميز بأنها عصوية موجبة لصبغة جرام غير مكونة للأبواغ، غير متحركة، سالبة للكتاليز والنترات، لاهوائية. وهذه البكتيريا تتميز أيضاً بأن الجدار الخلوي الخارجي غير منتظم وهى تظهر بأشكال مختلفة غير منتظمة (Irregular) والسلالات المعزولة حديثاً عادة ما تأخذ الأشكال V و Y و X ومن الممكن أن تكون مستقيمة أو منحنية قليلاً عند تنشيطها (Subculture). لا تستطيع هذه البكتيريا أن تخمر سكر اللاكتوز ونواتج التخمر هو حامض الخليك وحامض اللاكتيك بنسبة 3 : 2 وأيضاً يتكون حامض الفورميك، نتيجة لتخمر اللاكتوز. ولا يتكون غاز CO_2 نتيجة تخمر الجلوكوز، وتكون الإندول، تحلل الجيلاتين، وأفضل درجة حرارة للنمو هي من 37-41°م وأقصى درجة حرارة هي من 43-45°م، وأقل درجة حرارة تكون في حدود 25- 28°م، و الـ pH الأمثل يتراوح بين 6.5 - 7.0، وبعض الأنواع ثبت أنها تتحمل درجات منخفضة من الـ pH ولذلك فهي تستطيع أن تقاوم درجة الـ pH المخفضة وتمر خلال رحلتها في القناة الهضمية لتستقر في الأمعاء الغليظة وتلتصق بالخلايا الطلائية لمنطقة القولون، وكل السلالات المعزولة من الإنسان تستطيع أن تستخدم الجلوكوز و الجالاكتوز و اللاكتوز كمصدر للكربون، و تستطيع استخدام الأمونيا كمصدر وحيد للنيتروجين، وكثير من السلالات تحتاج إلى الرايبوفلافين (فيتامين B_2) لنموها عدا البكتيريا *Bifidobacterium bifidum*.

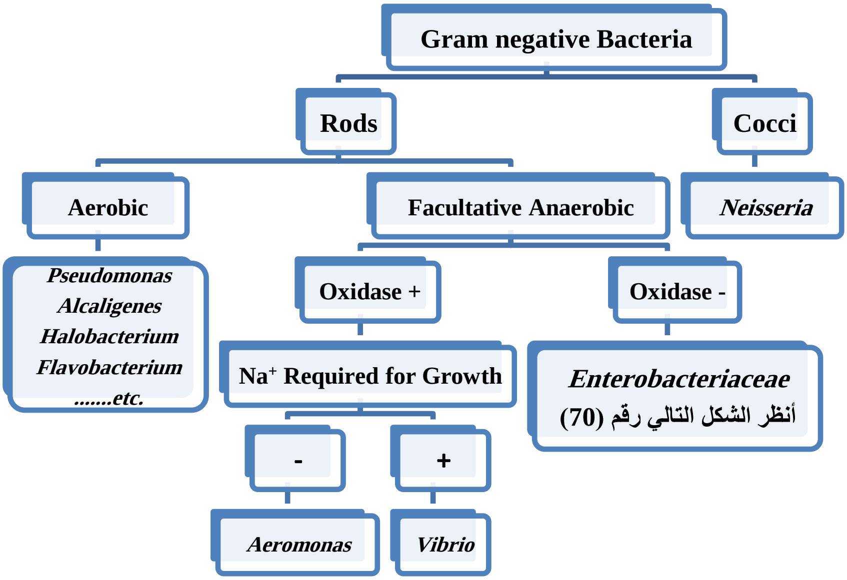
تسود هذه البكتيريا في براز الأطفال الذين يرضعون رضاعة طبيعية Breast-fed وتستوطن الأمعاء الغليظة لجسم الإنسان، وقد عزلت أيضاً من كل من الفم والمهبل، كما أنها توجد في القناة الهضمية للحيوانات المختلفة وفي نحل العسل.

التعرف على البكتيريا مجهولة معزولة من الأغذية:

عرفنا سابقاً أن تقسيم البكتيريا هو نظام ملائم مؤلف من أوصاف البكتيريا، وبناءً على ذلك تم التوصل إلى مخططات يتم من خلالها وصف إجراءات عملية متسلسلة للتعرف على مجموعة أو مجاميع معينة من البكتيريا، ومن الصعوبة بمكان ذكر جميع مخططات التعرف على البكتيريا هنا في هذه الفقرة من الكتاب نظراً لتنوعها وكثرتها لكن سيتم الاكتفاء بسرد مثال أو أثنين لكيفية استخدام مخططات مبسطة للتعرف على أمثلة للبكتيريا المهمة في مجال الأغذية استناداً إلى دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا.

المثال الأول:

ومن خلال هذا المثال سنفرض أنه تمكنا من عزل بكتيريا من غذاء معين كانت هذه البكتيريا عند دراستنا الأولية لأهم خصائصها كانت بكتيريا عصوية سالبة لتصبيغ جرام، لا هوائية اختيارا سالبة لإنزيم الأكسيديز **Oxidase**، عندئذ علينا اتباع المخطط التالي الذي يوضح أهم أجناس البكتيريا الموجبة لسالبة جرام **Gram negative Bacteria**.



شكل رقم (69) مخطط مبسط للتعرف على بعض أجناس البكتيريا السالبة لتصبيغ جرام ذات الأهمية في مجال الأغذية بواسطة بعض الصفات الظاهرية والاختبارات الكيموحيوية.

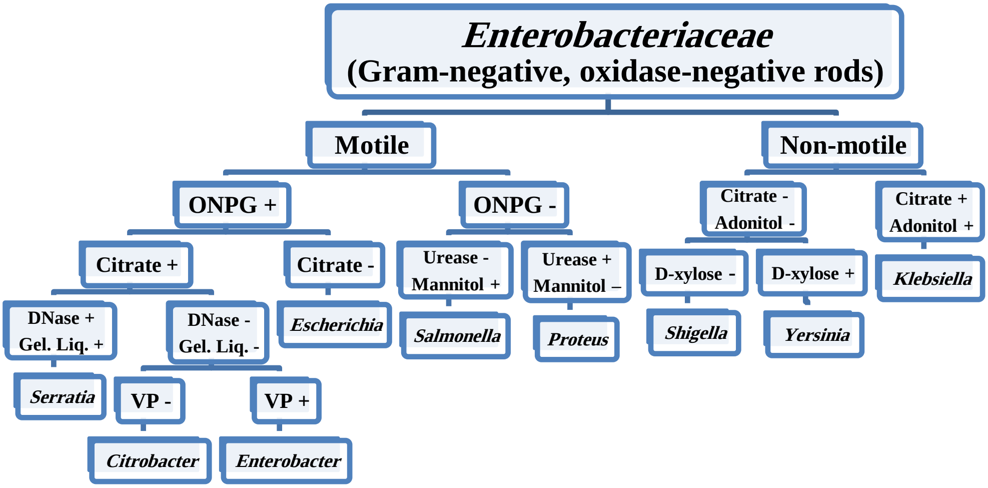
ومن هذا المخطط نكون قد عرفنا مبدئياً أن هذه البكتيريا المعزولة من المحتمل أن تكون أحد الأجناس المنتمية لعائلة *Enterobacteriaceae*، وللتأكد من ذلك نعود لدليل بيرجي لتصنيف البكتيريا **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** للتعرف على بعض الخصائصِ التفاضليةِ (التفريقية) لعائلة *Enterobacteriaceae* والعوائل القريبة منها.

جدول رقم (3) بعض الخصائصِ التفريقية لعائلة *Enterobacteriaceae* والعوائل القريبة منها.

Characteristic	*Enterobacteriaceae*	*Aeromonadaceae*	*Pasteurellaceae*	*Vibrionaceae*
Straight rods	+	D	+	D
Curved rods	-	D	-	D
Motility	D	+	-	+[a]
Oxidase test	-	+	+	+
Na⁺ required	-	-	-	D
Organic N required	-[a]	-	+	-[a]

* المصدر Bergey's Manual of Systematic Bacteriology بتصرف.
Symbols: (+) positive; (-) negative; (D) differs among organisms.
[a] A few exceptions may occur.

وكون البكتيريا المعزولة سالبة لإنزيم الأكسيديز فهذا لا يدع مجالاً للشك بانتمائها لأحد أجناس عائلة *Enterobacteriaceae*، وبالتالي نلجأ إلى المخطط التالي للتفريق بين أجناسها.



شكل رقم (70) مخطط مبسط للتعرف على بعض أجناس عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* التي تعتبر من العوائل البكتيرية ذات الأهمية في مجال الأغذية بواسطة بعض الاختبارات الكيموحيوية.

واستمراراً للمثال المذكور سنفترض أن أهم نتائج اختبار صفات العزلة المجهولة لُخصت في التالي: مُتَحَرِّكة، مفرزة لإنزيم اللاكتيز (من خلال التحلل المائي لمركب ONPG)، ولا تستطيع استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون، وهذه النتائج توضح انتماء العزلة المجهولة لجنس *Escherichia*. وللتعرف عليها وعلى أي من أنواع جنس *Escherichia* تنتمي نعود إلى دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا لنتعرف أكثر على أنواع هذا الجنس والاختبارات التي تُميّزُ بين أنواعه. واكمالاً لهذا المثال نورد الجدول التالي (المقتبس من دليل بيرجي) والذي يشير إلى التَميز بين الأنواع المنتمية لجنس *Escherichia*.

جدول رقم (4) التَميز بين الأنواع المنتمية لجنس *Escherichia*.

GENUS I. ESCHERICHIA

TABLE BXII.γ.197. Differentiation of the five species of *Escherichia*[a,b]

Test	*E. coli*	*E. coli* (metabolically inactive strains)	*E. blattae*	*E. fergusonii*	*E. hermannii*	*E. vulneris*
Indole	+	[+]	−	+	+	−
Citrate, Simmons	−	−	d	[−]	−[c]	−
Lysine decarboxylase	+	d	+	+	−[d]	[+]
Ornithine decarboxylase	d	[−]	+	+	+	−
Motility	+	−	−[e]	+	+	+
KCN, growth	−	−	−	−	+	[−]
Malonate utilization	−	−	+	d	−	[+]
D-Glucose, gas	+	−	+	+	+	+
Acid production from:						
D-Adonitol	−	−	−	+	−	−
D-Arabitol	−	−	−	+	−	−
Cellobiose	−	−	−	+	+	+
Dulcitol	d	d	−	d	[−]	−
Lactose	+	[−]	−	−[f]	d	[−][f]
D-Mannitol	+	+	−	+	+	+
Melibiose	[+]	d	−	−	−	+
D-Sorbitol	+	d	−	−	−	−
Mucate	+	d	d	−	+	[+]
Acetate utilization	+	d	−	+	[+]	d
Yellow pigmentation	−	−	−	−	+	d

[a]Data compiled from references Farmer (1999), Cowan et al. (1995), Holt et al. (1994), and Richard (1989). Reactions for indole for *E. fergusonii* and melibiose for *E. coli* differ slightly in these references. The reactions listed in this table are supported by our own unpublished data.

[b]Symbols: −, 0–10% positive; [−], 11–25% positive; d, 26–75% positive; [+], 76–89% positive; +, 90–100% positive. Results are for 48 h incubation at 36° ± 1°C.

[c]Delayed positive in approximately a fifth of *E. hermannii* strains.

[d]Delayed positive in a third of *E. hermannii* strains.

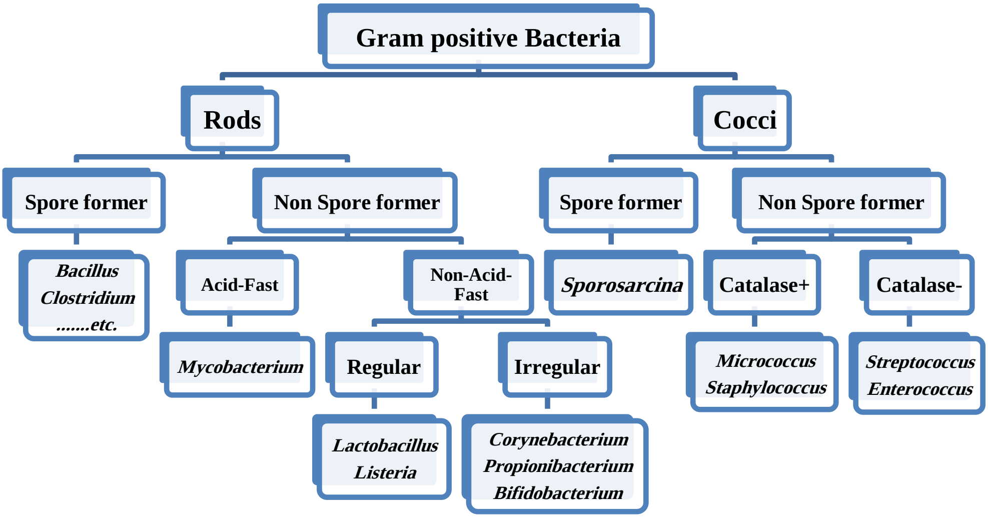
[e]75% of *E. blattae* strains will become motile after incubation of more than 2 d.

[f]Delayed positive in approximately two thirds of *E. fergusonii* and *E. vulneris* strains.

* المصدر **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.**

<u>المثال الثانى:</u>

ومن خلال هذا المثال سنفرض أنه تمكنا من عزل بكتيريا من غذاء معين كانت هذه البكتيريا عند دراستنا الأولية لأهم خصائصها كانت بكتيريا عصوية مستقيمة (منتظمة) موجبة لتصبيغ جرام، غير مكونة للجراثيم الداخلية، عندئذ علينا اتباع المخطط التالي الذي يوضح أهم أجناس البكتيريا الموجبة لتصبيغ جرام Gram positive Bacteria.



شكل رقم (71) مخطط مبسط للتعرف على بعض أجناس البكتيريا الموجبة لتصبيغ جرام ذات الأهمية في مجال الأغذية بواسطة بعض الصفات الظاهرية والاختبارات الكيموحيوية.

ومن هذا المخطط نكون قد عرفنا مبدئياً أن هذه البكتيريا المعزولة من المحتمل أن تنتمي إلى جنسي ***Lactobacillus*** أو ***Listeria***، وقد يكون غير ذلك فمن الممكن أن يكون الجنس ***Kurthia*** أو غيره من البكتيريا العصوية موجبة تصبيغ جرام غير المكونة للجراثيم، لكن ذلك الاحتمال ضعيف كونها نادرة التواجد في الأغذية، كما يجب علينا أيضاً تحديد انتماء هذه العزلة لأي من الأجناس السالفة الذكر.

وهنا يمكننا التأكد من خلال العودة إلى دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا في جزئه الثالث (**Firmicutes**)، من خلال جدول يوضح أهم صفات البكتيريا التي من الممكن أن تكون عصوية منتظمة موجبة لتصبيغ جرام غير مكونة للجراثيم الداخلية.

جدول رقم (5) بعض الخصائص التي تُميّزُ أجناس ***Lactobacillus*** و ***Listeria*** و ***Kurthia***.

Feature	*Lactobacillus*	*Listeria*	*Kurthia*
Motility	-[(a)]	+[(b)]	+[(c)]
Oxygen requirement for growth at 35°C	Facultative	Facultative	Aerobic
Catalase	-[(d)]	+	+
H_2S production	-	-	-[(e)]
Acid from glucose	+	+	-
Major peptidoglycan diamino acid	Lys or *meso*-DAP, or ornithine	*meso*-DAP	l-Lysine
Fatty acid type[(f)]	S, A, (U)	S, A, I	S, A, I
Mol % G + C	34 – 53	36 – 38	36.7 – 37.9

[*] المصدر **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** بتصرف.

(a) Most strains non-motile, but a few motile strains occur.
(a) All species motile at 20–25°C, poorly or non-motile at 37°C.
(c) Majority of strains motile, but non-motile strains do occur.
(d) Some strains give positive catalase reaction.
(e) Weak production of H_2S by some strains.
(f) S=saturated; U=monounsaturated; A=ante-iso-methyl-branched; I=iso-methyl-branched.

واستناداً إلى هذا الجدول المقتبس بتصرف من دليل بيرجي نرى أنه لتحديد انتماء البكتيريا المعزولة لأي من الأجناس المشار إليها أعلاه هناك عدد من الاختبارات ينبغي إجراؤها، وقد بعضها قد تكون غير متاحة ولذا في الغلب نختار الاسهل في الإجراء. واستمراراً للمثال المذكور أعلاه قمنا باختيار بعض الاختبارات المتاحة معملياً مثل اختبار الحركة، احتياج البكتيريا للأوكسجين للنمو عند درجة حرارة 35°م، اختبار إنزيم الكاتليز **Catalase**، إنتاج H_2S، وإنتاج حامض من الجلوكوز، وكانت صفات العزلة المختبرة كالتالي: مُتَحَرِّكة، لا هوائية اختياراً، مفرزة لإنزيم الكاتليز، لا تنتج H_2S، مخمرة الجلوكوز.

أن من أكثر الصفات المختبرة تأكيداً لما تم ذكره من أن البكتيريا المعزولة تنتمي إلى جنسي *Lactobacillus* أو *Listeria* هو كونها لا هوائية اختيارياً وهذا ينفي مطلقاً انتمائها لجنس *Kurthia*. وللتفريق بين جنسي *Lactobacillus* أو *Listeria* نجد أن جنس *Listeria* متحرك (وهذا ما ظهر في نتائج الاختبارات) في حين أن معظم سلالات جنس *Lactobacillus* تكون غير متحركة، إلا أننا هنا لا نستطيع الجزم بانتماء العزلة المجهولة لجنس *Listeria* لوجود سلالات متحركة من جنس *Lactobacillus*، كما أن إفراز العزلة المجهولة لإنزيم الكاتليز كذلك لا يؤكد انتمائها لجنس *Listeria*، حيث أن هناك سلالات من جنس *Lactobacillus* تفرز إنزيم الكاتليز، ولكون كلا الجنسين يخمران الجلوكوز، ولا ينتجان H_2S، لذا تبقى الحيرة في انتماء البكتيريا المعزولة لأي منهما.

أن ما يفرق بين جنسي *Lactobacillus* أو *Listeria* يكمن في تركيب الليبيدات والأحماض الدهنية التي تكون الغشاء البلازمي للبكتيريا، حيث أن جنس *Lactobacillus* يتميز عن *Listeria* باحتوائه على الأحماض الدهنية أُحادِيَّة عدم التشبع، والتي إن وجدت كان ذلك دلالة على انتماء البكتيريا المعزولة لجنس *Lactobacillus* وإن لم توجد دل ذلك على انتمائها لجنس *Listeria*، لكن هذا الاختبار يحتاج إلى كلفة عالية وتقنيات دقيقة وتجهيزات معقدة تتمثل في وجود جهاز كروماتوجرافيا الغاز – سائل Gas-Liquid Chromatography، ولذلك فليس من السهل اجرائه في الاختبارات الروتينية مثله في ذلك مثل اختبار تحديد نسبة القواعد النيتروجينية G + C.

وللتخلص من هذه الحيرة والجزم بانتماء العزلة المجهولة لأي من الجنسين نلجأ إلى استخدام الأوساط الغذائية الانتقائية Selective Media المتمثلة في بيئة MRS المتخصصة في عزل جنس *Lactobacillus* وينمو فيها بشكل جيد في حين لا يتمكن جنس *Listeria* من النمو فيها. فلو افترضنا أن عزلتنا المجهولة في هذا المثال لم تنمو بشكل جيد على وسط MRS الاختياري فهنا نصل إلى قناعة بانتماء هذه العزلة لجنس *Listeria*. وللتعرف عليها وعلى النوع الذي تنتمي إليه نعود إلى دليل بيرجي لتصنيف البكتيريا لنتعرف أكثر على أنواع هذا الجنس والاختبارات التي تُميّزُ بين أنواعه. واكمالاً لهذا المثال نورد الجدول التالي (المقتبس من دليل بيرجي) والذي يشير إلى الخصائص الوصفية الإضافية لتَمييز الأنواع المنتمية لجنس *Listeria*.

جدول رقم (6) الخصائص الوصفية الإضافية لتَمييز الأنواع المنتمية لجنس *Listeria*.

GENUS I. LISTERIA

TABLE 41. Additional descriptive characteristics for differentiating species of the genus *Listeria*[a,b]

Characteristic	*L. monocytogenes*	*L. grayi*	*L. innocua*	*L. ivanovii*	*L. seeligeri*	*L. welshimeri*
Gram stain	+	+	+	+	+	+
Acid production from:						
L-Arabinose	–	–	–	d	–	–
Dextrin	d	+	–	–	ND	ND
Galactose	d	+	–	d	–	–
Gluconate	–	d	–	–	d	–
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
Glycogen	–	–	–	–	–	–
5-Ketogluconate	d	+	d	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
D-Lyxose	d	d	d	–	–	d
Melezitose	d	–	d	d	d	d
α-D-Melibiose	–	d	–	–	–	–
Sucrose	d	–	d	d	d	+
Sorbitol	d	–	–	–	ND	ND
Sucrose	–	–	d	d	+	D
D-Tagatose	d	–	d	–	–	–
Trehalose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+
D-Xylitol	+	d	+	+	+	+
Hydrolysis of:						
Esculin	+	+	+	+	+	+
Cellulose	–	–	–	–	ND	ND
Hippurate	+	–	+	+	ND	ND
Starch	d	+	d	δ	d	d
Voges–Proskauer	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	+	+	+	+	+	+
Leucine esterase	d	+	+	d	+	+
Chymotrypsin	+	+	+	d	+	+
α-Glucosidase	d	+	+	+	d	–
β-Glucosidase	+	+	+	+	–	+
N-Acetyl-β-glucosamidase	d	+	d	d	+	–
Growth in peptone water plus 10% (w/v) NaCl	d	+	+	d	d	+
Pathogenicity for mice	+	–	–	+	–	–
Cell-wall type	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ	A1γ
Major peptidoglycan diamino acid	*meso*-DAP	*meso*-DAP	*meso*-DAP	*meso*-DAP	*meso*-DAP	*meso*-DAP
Major menaquinone	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7	ND	ND
Mol% G+C (T_m)	37–39	41–42.5	36–38	37–38	36	36

[a]Symbols: +, >85% positive; d, different strains give different reactions (16–84% positive); –, 0–15% positive; w, weak reaction; ND, not determined. *meso*-DAP, *meso*-diaminopimelic acid.
[b]Data from Seeliger and Jones (1986), Kämpfer et al. (1991) and Rocourt and Catimel (1985).

* المصدر Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

مجاميع البكتيريا المهمة فى مجال ميكروبيولوجيا الأغذية:

وبعد أن استعرضنا بعض التفاصيل العامة عن العائلات الأجناس والأنواع البكتيرية المهمة في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية يمكننا تقسيم البكتيريا المهمة في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية إلى مجاميع كالتالي:

1- بكتيريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria:

من أهم ما ينتمى إلى هذه المجموعة الأجناس التابعة لعائلة *Lactobacillaceae* وخصوصاً الأنواع متجانسة التخمر Homofermentative وكذلك الأجناس التابعة للعائلة *Leuconostocaceae* وجنس *Lactococcus* الذي ينتمي للعائلة *Streptococcaceae*، ولهذه الأجناس أهمية كبرى في تصنيع الأغذية والألبان المتخمرة، كما تستخدم صناعياً في انتاج لاكتات الكالسيوم Calcium lactate المستخدم في الأغراض الطبية والدوائية.

2- بكتيريا حامض الخليك Acetic acid bacteria:

هي تلك البكتيريا الهوائية العصوية السالبة لصبغة جرام التي تؤكسد الكحول الإيثيلي إلى حامض الخليك وتنتمي لعائلة *Acetobacteraceae* وتستخدم هذه البكتيريا صناعياً في انتاج الخل الذي يُستخدم لتتبيل الأطعمة وحفظها. كما تستخدم صناعياً في أكسدة السكر الكحولي سوربتيول إلى سوربوز حيث يستخدم كمادة بادئة في تحضير حامض الأسكوربيك Vitamin C.

3- بكتيريا حامض البيوتريك Butyric acid bacteria:

معظم البكتيريا التي تنتمي لهذه المجموعة هي البكتيريا العصوية اللاهوائية الموجبة لصبغة جرام المكونة للجراثيم (الأبواغ) التابعة لعائلة *Clostridiaceae*. وتقوم هذه البكتيريا بإنتاج حامض البيوتريك في الأغذية ذات الحموضة العالية (pH اقل من 4,6) كالطماطم والفواكه وعصائرها المعلبة كما تعمل على تحلل البروتين الى أحماض امينية ثم إلى امونيا مما يتسبب في نقص البروتين في هذه الأغذية المحفوظة وتنشط هذه البكتيريا في درجات الحرارة المعتدلة.

4- بكتيريا حامض البروبيونيك Propionic acid bacteria:

تنتمي هذه المجموعة أساساً لعائلة *Propionibacteriaceae*، وتتواجد هذه البكتيريا في معدة الحيوانات المجترة حيث تقوم بتكوين الأحماض الدهنية خاصة حامض البروبيونيك، كما تقوم بتحويل اللاكتات الناتجة عن مختلف التخمرات إلى بروبيونات وبذلك تقوم بدور مهم في إنضاج الجبن السويسري وإكسابه النكهة المميزة له.

5- البكتيريا المحللة للبروتين Proteolytic bacteria:

وهي مجموعة متباينة من البكتيريا تعمل على تحليل البروتينات تحليلاً مائياً إلى مكوناته من الاحماض الامينية من خلال امتلاكها للإنزيمات المحللة للبروتين Proteolytic، وهذه

المجموعة من البكتيريا تؤدي أدوار سلبية وأخرى إيجابية، ومن أمثلة أدوارها السلبية دورها في تلف الاغذية البروتينية وإنتاجها لروائح كريهة عند تحليلها لبروتينات الغذاء تحت الظروف اللاهوائية، لكنها في المقابل تستخدم في تسوية وإنضاج بعض أنواع الجبن وإنتاج الإنزيمات المحللة للبروتين المستخدمة في منظفات الملابس وغيرها من الاستخدامات الصناعية الأخرى، وتتمثل البكتيريا التابعة لهذه المجموعة بشكل أساسي في اجناس *Bacillus* و *Clostridium* و *Pseudomonas* و *Proteus* و *Enterococcus*.

6- البكتيريا المحللة للدهون Lipolytic bacteria:

هي البكتيريا التي تفرز إنزيم اللايبيز Lipase الذي يحلل الدهون إلى أحماض دهنية حرة free fatty acids وجليسرول Glycerol، وبعض هذه الأحماض الدهنية تكون طيارة وذات طعم ورائحة حادة بحيث تجعل الغذاء ذا طعم متزنخ Rancid taste. وهذه المجموعة من البكتيريا أيضاً تؤدي أدوار سلبية مثل دورها في تلف الاغذية الدهنية، وأدوار أخرى إيجابية مثل استخدامها لإنتاج الإنزيمات المحللة للدهون المستخدمة في منظفات الملابس وغيرها من الاستخدامات الصناعية الأخرى، وتتمثل البكتيريا التابعة لهذه المجموعة بشكل أساسي في اجناس *Pseudomonas* و *Alcaligenes* و *Serratia* و *Micrococcus* و *Achromobacter*.

7- البكتيريا المحللة للسكريات Saccharolytic bacteria:

وهي البكتيريا القادرة على تحليل السكريات المتعددة والثنائية الى سكريات بسيطة ومن أمثلتها البكتيريا المحللة للنشأ المفرزة لإنزيمات الاميليز مثل *Bacillus subtilis* و *Clostridium butyricum* و *Clostridium acetobutyricum*، وفي الغالب تتسبب هذه البكتيريا في فساد الأغذية الحاوية على كربوهيدرات معقدة، لكنها في الجانب المقابل تستخدم في إنتاج الإنزيمات المحللة للنشأ وكذلك في كثير من الصناعات.

8- البكتيريا المحللة للبكتين Pectolytic bacteria:

المواد البكتينية مواد كربوهيدراتية معقدة التركيب توجد بصورة طبيعية في الفواكه والخضروات تدخل في تركيب الصفائح الوسطى وتصمغ الخلايا في النسيج النباتي الحديث بحيث تعطي الشكل او الهيكل الخارجي للثمار، وتقوم بعض أنواع البكتيريا بتحليل المواد البكتينية من خلال إفرازها لإنزيمات البكتينيز Pectinase التي تعمل على تطرية الأنسجة النباتية وبالتالي فساد الفواكه والخضروات، لكنها أيضاً تستخدم في إنتاج هذه الإنزيمات صناعياً حيث تستخدم كعامل ترويق في صناعة عصير الفاكهة حيث تحلل المواد البكتينية الموجودة في العصير التي تجعل العصير غير رائق أو متجانس، ومن أهم أجناس البكتيريا المحللة للبكتين *Erwinia* و *Bacillus* و *Clostridium*.

9- البكتيريا المعوية Intestinal bacteria (بكتيريا القولون Coliform bacteria):

بكتيريا القولون كما عرفناها سابقاً تعرف على أنها بكتيريا سالبة لتصبيغ جرام سالبة الإنزيم الاوكسيديز، عصوية غير متجرثمة يمكن أن تنمو هوائياً على بيئة أجار تحتوي على أملاح الصفراء، تخمر اللاكتوز خلال 48 ساعة عند 37°م مع إنتاج حامض وغاز، ومن أهم أجناسها *Escherichia*، *Enterobacter*، *Citrobacter* وغيرها. ان سهولة تنمية بكتيريا القولون وتفريقها جعلها تستعمل كأحياء دالة Indicator microorganism على الشروط الصحية والتلوث البرازي للأغذية والماء، وهي تُقسم إلى: بكتيريا القولون البرازية ويكون مصدرها التلوث عن طريق مياه المجاري أو براز الإنسان والحيوان وتتمثل في بكتيريا *Escherichia coli* والتي يعد وجودها كما ذكرنا سابقاً دلالة على تلوث من مصدر برازي Fecal sours، وبكتيريا القولون غير البرازية وهي إلى جانب تواجدها في الأمعاء يمكن أن تتواجد في التربة وأسطح النباتات....الخ ومن أهم أمثلتها بكتيريا *Enterobacter aerogenes*. ويمكن تمييز بكتيريا القولون البرازية عن غير البرازية بتنميتها عند درجة حرارة 44.5°م حيث أن بكتيريا القولون غير البرازية تنمو عند درجة حرارة 37°م ولا تنمو عند درجة 44.5°م، كما يمكن أن تستخدم الاختبارات التي تعرف باسم IMViC للتفريق بينها كما ذكرنا سابقاً.

10- البكتيريا المحبة والمتحملة للبرودة Psychrophilic and Psychrotrophic:

أن مصطلح Psychrophilic (المحبة للبرودة) يشير إلى البكتيريا التي تنمو بصورة مثلى في درجة حرارة 15°م أو أقل ولها حد ادنى 0°م. وتتسبب في العادة بتلف الأغذية المحفوظة بالتبريد، لكن مصطلح Psychrotrophic (المتحملة للبرودة) يشير إلى تلك البكتيريا التي تستطيع النمو بشكل لا بأس به عند درجات حرارة التبريد التجارية التي تتراوح بين 2 - 7°م، بغض النظر عن درجة نموها المثلى، وعادة تكون من البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة أي أن درجة نموها المثلى ما بين 20- 32°م.

وغالبية البكتيريا متحملة البرودة التي تتواجد في منتجات الأغذية تكون في الغالب سالبة لتصبيغ جرام، غير مكونة للأبواغ، موجبة لأنزيم الأكسيديز، عصوية صغيرة عادة تنتمي لأجناس *Pseudomonas* و *Alcaligenes* و *Flavobacterium* وبعض أنواع بكتيريا القولون Coliform Bacteria كذلك بعض البكتيريا الموجبة لتصبيغ جرام مثل بعض الأنواع التابعة لجنس *Bacillus*. وتكمن أهمية هذه البكتيريا كونها تسبب أنواعاً مختلفة من الفساد مثل المرارة والتعفن والزناخة وما يشبه نكهة الفواكه مما يؤدي إلى الغذاء غير صالح للاستهلاك.

ولعد مثل هذه الأحياء المجهرية تُستعمل طريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count حيث تحضن الأطباق عند درجة حرارة 7°م لمدة 10 أيام.

11- البكتيريا المحبة للحرارة Thermophilic bacteria:

هي البكتيريا التي تكون درجة الحرارة المثلى لنموها فوق 50°م، ويمكن أن تنمو عند درجة حرارة البسترة (62.8°م) بطريقة الحرارة الواطئة لوقت طويل LTLT، ومن أشهرها *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* وبعض أنــواع الجنس *Bacillus* مثل *B. stearothermophilus*، وهذه الأنواع تتمكن من النمو والتكاثر تحت ظروف البسترة بطريقة الحجز Holding Method مسببة ارتفاع الحموضة في الحليب لان أكثرها يخمر اللاكتوز. أما الأنواع البكتيريا المحبة للحرارة المكونة للجراثيم (الأبواغ) فهي تتسبب في فساد الأغذية المعلبة.

12- البكتيريا المقاومة للحرارة Thermoduric bacteria:

هي البكتيريا التي تقاوم درجات أعلى من الدرجة القصوى لنموها، وفي مجال صناعة الأغذية وعلى الأخص صناعة الألبان يقصد بها تلك الأنواع التي تقاوم المعاملات الحرارية مثل البسترة، وتتضمن أنواعاً من الجنس *Micrococcus* والجنس *Streptococcus* والجنس *Enterococcus* و كذلك الجنس *Lactobacillus* إضافةً إلى Aerobic spore formers وقليل من العصيات السالبة لتصبيغ جرام. ولمعرفة درجة التلوث بهذه البكتيريا تستعمل طريقة العد القياسي بالأطباق Standard Plate Count للحليب الخام بعد بسترته مختبرياً. إن الحد من ارتفاع تعداد هذه الأحياء المجهرية يهم المنتج والمصنع على حد سواء حيث أنها تؤدي إلى زيادة عدد الأحياء المجهرية للحليب المبستر والمنتجات الأُخرى.

13- البكتيريا المحبة للملوحة Halophilic bacteria:

وهي البكتيريا التي تحتاج في نموها إلى تركيز معين من كلوريد الصوديوم NaCl الذائب، وتنقسم إلى ثلاثة أقسام هي: البكتيريا المحبة للملوحة الطفيفة Slightly halophilic وتنمو بوجود تراكيز ملحية بين 2 – 5 %، والمحبة للملوحة المعتدلة Moderately halophilic تنمو بوجود تراكيز ملحية بين 5 – 20 %، والمحبة للملوحة العالية Extremely halophilic وتنمو بوجود تراكيز ملحية بين 20 – 30 %.

ومن امثلة أجناس هذه البكتيريا *Halobacterium* و *Sarcina* و *Enterococcus* و *Staphylococcus* و *Micrococcus* و *Pseudomonas* و *Vibrio* و *Pediococcus* و *Achromobacter*، وتتسبب في تلف الاسماك المملحة والجبن والاغدية المحفوظة في المحاليل الملحية كالمخلات.

14- البكتيريا المحبة للسكريات Saccharophilic bacteria:

وهي البكتيريا المحبة للتراكيز العالية Osmophilic bacteria، وتتمثل في تلك الأنواع التي تنمو بصورة جيدة في تراكيز عالية من السكر، وفي الغالب تُطلق هذه التسمية على البكتيريا المتحملة للتراكيز العالية من السكر والمتمثلة في أنواع جنس *Leuconostoc* الذي يتحمل تراكيز عالية من السكر تتراوح بين 55- 60 %، ويتسبب في مشاكل في صناعة السكر والأغذية المحفوظة بالمحاليل السكرية.

15- البكتيريا المكونة للغاز Gas forming bacteria:

يحدث نتيجة نمو بعض أنواع البكتيريا تكون كميات من الغازات، ومن أشهر أنواع هذه البكتيريا بكتيريا القولون Coliform bacteria التي تخمر اللاكتوز منتجة غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 والهيدروجين، وكذلك البكتيريا المكونة للأبواغ مثل *Clostridium butyricum* التي تنتج كمية هائلة من غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 والهيدروجين، وكذلك أنواع من بكتيريا حامض اللاكتيك متباينة التخمر Heterofermentative التي تنتج إضافة إلى حامض اللاكتيك غاز ثاني أكسيد الكربون ومركبات أُخرى وتؤدي إلى تلف بعض منتجات الألبان مثل الجبن السويسري وجبن التشيدر.

في حين تمثل بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* الجانب المفيد لهذه المجموعة من البكتيريا حيث تستخدم كبادئ في صناعة الجبن السويسري وغاز CO_2 الذي تنتجه يودي لتكوّن الثقوب المميزة لهذا النوع من الجبن.

16- البكتيريا المكونة للزوجة Rope forming bacteria:

تحدث اللزوجة Ropiness نتيجة نمو بعض أنواع البكتيريا المكونة للكبسولة وذلك نتيجة للمركبات اللزجة الموجودة في كبسولة الخلية البكتيرية المكونة من الصمغ Gums والمواد المخاطية Mucus.

ومن الأجناس البكتيرية المكونة للزوجة جنس *Alcaligenes* و *Enterobacter* وسلالات معينة من بكتيريا حامض اللاكتيك التي تسبب اللزوجة أو التكون الخيطي في الحليب.

17- البكتيريا المنتجة للصبغات Pigmented bacteria:

تتسبب بعض أنواع البكتيريا عند نموها في الأغذية إلى أنتاج صبغات توثر على تقبل المستهلك لهذا الغذاء، ومن أمثلة هذه البكتيريا جنس *Pseudomonas* الذي ينتج مجموعة من الصبغات والألوان مثل اللون الرمادي المزرق والبني والأصفر المخضر والأصفر، وكذلك جنس *Flavobacterium* الذي ينتج اللون الأصفر وجنس *Serratia* الذي ينتج اللون الأحمر، وبكتيريا *Lactobacillus plantarum* التي تنتج صبغة شبيهه بلون الصدأ تسبب تبقع الجبن.

18- البكتيريا المسببة للتسمم الغذائى Food Poisning bacteria:

التسمم الغذائي هو تلك الأمراض التي تحدث بسبب نمو الميكروبات المفرزة للسموم وإفرازها مركبات كيمائية ذات تأثير سام بالنسبة للإنسان. وعادة يطلق لفظ التسمم الغذائي على أي اضطرابات تحدث بعد تناول الغذاء، وبمعنى أدق فإن مصطلح Food poisoning يشمل مصطلح التسمم الغذائي Food intoxication والذي يطلق على المرض الناشئ عن وجود مادة سامة في الغذاء المتناول (وهذه المادة السامة قد تكون سموم بكتيرية أو فطرية أو سموم طبيعية كتلك المتواجدة في بعض النباتات والحيوانات السامة أو سموم كيميائية كالمعادن الثقيلة أو المبيدات أو تلك الناتجة عن تفاعل الغذاء مع معدن العبوة أو الإناء الذي تحتويه أو بعض المضافات)، وكذلك مصطلح العدوى الغذائية Food infection الذي يعني انتقال العدوى أو المرض بواسطة الغذاء وتنتقل العدوى عن طريق غزو أو نمو البكتيريا في الغذاء ثم انتقالها مهاجمة الأغشية المخاطية في الأمعاء ونموها فيها وإحداث الضرر للأنسجة السليمة في الجسم. والتسمم الغذائي ذو مدلول واسع يستدل عليه ببعض الاضطرابات المعوية مع التقيؤ والإسهال أو كلاهما مع ارتفاع في درجة الحرارة (حمى) في بعض الأحيان وقد يصاحب ذلك تأثيرات عصبية وفسيولوجية أخرى.

وتنقسم حالات التسمم الغذائي كما سبق الإشارة إليه إلى:

أولاً- تسمم غذائى Food intoxication

في هذه الحالة توجد سموم الميكروبات في الطعام الذي يحدث الحالة المرضية بعد تناوله. ومثال عليه التسمم البوتشليني Botulism والذي تسببه بكتيريا *Clostridium botulinum* وكذلك السموم المعوية التي تفرزها المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، والسم المسبب للقيء Emetic Toxin الذي تفرزه *Bacillus cereus*.وهذه السموم تعرف بالسموم الخارجية Exotoxins. والسموم البكتيرية الخارجية Bacterial Exotoxins هي مواد قابلة للانتشار تفرز من داخل الخلية البكتيرية التي تنتجها إلى الوسط الخارجي المحيط بالبكتيريا، سواء أكان هذا الوسط بيئة غذائية في المختبر، أو نسيجاً من خلايا العائل، أو مادة غذائية. ويمكن الحصول على السموم الخارجية، من المزرعة النامي بها البكتيريا وذلك بترشيح المزرعة خلال المرشحات البكتيرية فتحجز خلايا البكتيريا وتسمح للسائل المحتوى على هذه السموم الخارجية بالنفاذ من خلالها.

والسموم الميكروبية الخارجية عبارة عن مواد بروتينية ذات وزن جزيئي مرتفع قد يصل إلى مليون دالتون، وفي الغالب فإن الإنزيمات المحللة للبروتين تهضم هذه السموم وبالتالي فإن هذه السموم لا تؤثر على الجسم إذا ما تم تناولها عن طريق الفم ويستثنى من تلك السم البوتشوليني المفرز من قبل بكتيريا *Clostridium botulinum*، وسم البكتيريا العنقودية الذهبية المفرز من قبل بكتيريا *Staphylococcus aureus*، والسم المسبب للقيء الذي تفرزه *Bacillus cereus*، حيث لا تتأثر هذه السموم بالإنزيمات المحللة للبروتين.

وتفقد السموم الخارجية سميتها بالتخزين الطويل أو بتعريضها للحرارة العالية أو بمعاملتها ببعض المواد الكيميائية مثل الفينول والأحماض والفورمالدهيد، وذلك نتيجة مسخ أو دنترة البروتينات والتأثير على الروابط بين تراكيب البروتينات المكونة لهذه السموم. ونتيجة لفقد السمية بواسطة الفورمالدهيد، يتحول السم **Toxin** من مادة سامة، إلى مادة غير سامة تدعى توكسويد **Toxoid** وهي مادة ذات خواص أنتيجينية تستخدم كأنتجين لوقاية الأشخاص المعرضين للتسمم بتلك السموم الخارجية، وذلك لأن التوكسويدات **Toxoids** تحفز الجسم على إنتاج مضادات السم **Antitoxins** التي تعادل السم البكتيري المتكون بجسم العائل.

تتفاوت شدة السموم الخارجية للبكتيريا، ويعتبر النوع **A** من السم البوتشولينى **Botulism** أقوى سم معروف، وأقل جرعة قاتلة **Minimum Lethal Dose (MLD)** من هذا السم لفأر التجارب هي 2.5×10^{-5} ميكروجرام، في حين أن الجرعات القاتلة من السموم الخارجية الميكروبية الأخرى أقل من ذلك بكثير، فيلزم حوالي 5 ميكروجرام من سم البكتيريا العنقودية الذهبية لقتل الأرنب. وتعرف أقل جرعة قاتلة **Minimum Lethal Dose (MLD)** بأنها أقل كمية من السم تقتل حيوان التجارب القياسي القابل للإصابة في وقت معين.

وللسموم الخارجية البكتيرية تأثير متخصص على أجزاء معينة من جسم المصاب فمنها ما يؤثر على الجهاز الهضمي ويسمى سم معوي **Enterotoxin** مثل سموم بكتيريا الكوليرا ***Vibrio cholerae***، والبكتيريا العنقودية ***Staphylococcus aureus***، ومنها ما يؤثر على الخلايا ويقتلها، ويسمى سم خلوي **Cytotoxin** مثل سم ***Corynebacterium diphtheriae*** الدفتريا، ومنها ما يؤثر على الجهاز العصبي، ويسمى سم عصبي **Neurotoxin** مثل سموم بكتيريا ***Clostridium botulinum*** و بكتيريا ***Clostridium tetani*** (السم البوتشولينى وسم التتانوس أو الكزاز)، ومنها ما يسبب الإحمرار للجسم ويسمى السم المولد للإحمرار **Erythrogenic toxin** مثل سم بكتيريا ***Streptococcus pyogenes***.

ثانياً- عدوى غذائية Food infection:

وتحدث هذه الإصابات نتيجة تناول طعام يحتوي على الميكروبات المسببة للإصابة وذلك نتيجة للسموم الداخلية **Endotoxins** التي تتواجد في جدار الخلية البكتيرية، فكثير من الريكتسيا، والبكتيريا السالبة لصبغة جرام تكون سموما تبقى بداخل خلاياها ولا تخرج منها إلى الوسط المحيط، إلا بعد تحلل تلك الخلايا. والسموم الداخلية هي مواد ذات خواص أنتجينية ضعيفة، تتكون من مواد معقدة تحتوي على الليبيدات **Lipids**، وعديد السكريات **Polysaccharide**، والبروتين **Protein (Lipo-Polysaccharide-Protein Complex)**.

معظم أنواع البكتيريا المرضية، تكون سموما داخلية، وتلعب هذه السموم دوران مميزان في العدوى، يتمثل الدور الأول في إحداث رفع درجة حرارة الجسم (سم مسبب للحمى Pyrogenicity)، أما الدور الثاني فيتمثل في إحداث حالة التسمم Toxicity. ويعود حدوث الحمى والسمية، إلى جزء عديد السكريات الدهني Lipopolysaccharide الداخل في تركيب السم، وتعود الخواص الأنتيجينية، إلى الجزء البروتيني من تركيب السم.

وهنا يمكن تقسيم العدوى الغذائية Food Infection إلى قسمين:

القسم الأول: وفيه لا يكون الغذاء بالضرورة هو البيئة الصالحة لنمو الميكروبات المرضية ولكن هناك طرق مختلفة لنقل الميكروب المرضي للغذاء مثل الإصابة بالسل والدفتيريا والتيفوئيد والكوليرا...الخ.

القسم الثاني: وفيه يكون الغذاء هو المصدر الأساسي للميكروبات والتي تنمو وتتزايد في العدد إلى الحد الذي يسبب إصابة المستهلك وعادة تكون بواسطة بكتيريا السالمونيلا.

وقد حصرت أنواع البكتيريا الرئيسة المسببة للتسمم الغذائي بالتالي:

1- *Clostridium botulinum* وتسبب تسمم غذائي **Food intoxication**.
2- *Staphylococcus aureus* وتسبب تسمم غذائي **Food intoxication**.
3- *Bacillus cereus* وتسبب تسمم غذائي وعدوى بكتيرية مع سم يفرز في الأمعاء.
4- *Clostridium perfringens* عدوى بكتيرية مع سم يفرز في الأمعاء.
5- *Salmonella spp.* وتسبب عدوى غذائية **Food infection**.
6- *Shigella spp.* وتسبب عدوى غذائية **Food infection**.
7- *Escherichia coli* المهاجمة للأمعاء وتسبب عدوى بكتيرية مع سم يفرز في الأمعاء.
8- *Listeria monocytogenes* وتسبب عدوى غذائية **Food infection**.
9- *Campylobacter jejuni* وتسبب عدوى غذائية **Food infection**.
10- *Yersinia enterocolitica* و *Y. pseudotuberculosis* وتسببان عدوى غذائية.
11- *Vibrio cholerae* و *V. parahaemolyticus* و *V. vulnificus* عدوى غذائية.
12- بكتيريا أخرى مثل *Aeromonas hydrophila* و *Plesiomonas shigelloides* و *Cronobacter sakazakii* و *Coxiella burnetii* و *Mycobacterium spp.* و *Brucella spp.* و...الخ وجميعها تسبب عدوى غذائية **Food infection**.

البكتيريا المسببة للتسمم الغذائي

1- بكتيريا *Clostridium botulinum*:

تتسبب بكتيريا *Clostridium botulinum* في حدوث التسمم الوشقي (البوتشليني) Botulism Intoxications، ويعتبر هذا النوع من التسمم أخطر أنواع التسمم البكتيري من حيث فعاليته ولكنه ولله الحمد قليل الانتشار على مستوى العالم. وتقدر نسبة الوفيات في حالات التسمم هذه بـ 65 % وقد تبلغ في بعض الحالات 100 %، وقد سجلت أول حالة تسمم من هذا النوع في عام 1735م، وقد سمي هذا التسمم من قبل الأطباء الألمان في القرن التاسع عشر باسم (بوتشلزم Botulism) وهو ما يقابل كلمة Butulismus باللاتينية التي تعني Botulus أي السجق أو النقانق حيث كان حدوث التسمم يقترن بتناول السجق الملوث ثم وجد بعد ذلك أنه يمكن أن يقترن بأغذية مختلفة أخرى.

وهناك أنواع من هذه البكتيريا لا تنتج السم على الرغم من أنها تشبه البكتيريا المنتجة للسم من حيث الخصائص التنموية والمورفوجية والكيميائية وتعرف هذه البكتيريا باسم *Clostridium pseudobotulinum*.

وقد قسمت بكتيريا *Clostridium botulinum* إلى سبعة مجاميع أو سلالات ، وذلك حسب نوعية السم الذي تفرزه كل منها وتختلف هذه السلالات بالنسبة لفعالية سمومها ضد الإنسان أو الحيوان، وكذلك بالنسبة لبعض خصائصها الكيميوحيوية، بالإضافة إلى اختلاف مقاومة سبورات كل منها للحرارة. وتتمثل هذه السلالات فيما يلي:

السلالة الأولى (A):

أبواغ هذه السلالة من أكثر السلالات مقاومة للحرارة العالية، ولها المقدرة على تحليل البروتينات منتجة روائح كريهة نتيجة هذا التحليل البروتيني، لكنها لا تحلل السكريات، وسم هذه السلالة وكذلك سم السلالة الخامسة (E) يعتبران أكثر السموم فعالية ضد الإنسان.

السلالة الثانية (B):

أبواغ هذه السلالة أقل مقاومة للحرارة من السلالة الأولى (A). ولبعض خلايا هذه السلالة المقدرة على تحليل البروتينات لكنها لا تحلل السكريات. وسم هذه السلالة أقل فعالية ضد الإنسان.

السلالة الثالثة (C):

أبواغ هذه السلالة لا تقاوم الحرارة كثيراً، وليس لخلايا هذه السلالة المقدرة على تحليل البروتينات والسم الذي تفرزه له تأثير كبير على الحيوانات خاصة الطيور التي تلتقط غذائها من طين قاع البرك المائية الملوثة. وهذه السلالة من أكثر السلالات انتشاراً في العالم. وتنقسم هذه السلالة إلى قسمين هما C_2 , C_1 ولا يتأثر الإنسان بالسم الذي تفرزه هذه السلالة.

السلالة الرابعة (D):

أبواغ هذه السلالة لا تقاوم الحرارة كثيراً، كذلك ليس لها القدرة على تحليل البروتينات تماماً كما في السلالة الثالثة (C) إضافة إلى أن السم الذي تفرزه هذه السلالة يؤثر على الحيوانات ولا يؤثر على الإنسان.

السلالة الخامسة (E):

أبواغ هذه السلالة لا تقاوم الحرارة كثيراً، وليس لخلايا هذه السلالة المقدرة على تحليل البروتينات ولكنها تحلل عدداً من السكريات. ويعتبر الإنسان أكثر حساسية للسم الذي تفرزه هذه السلالة أكثر من غيره من الحيوانات.

السلالة السادسة (F):

أبواغ هذه السلالة مقاومة للحرارة العالية وبعض أنواع السلالة لها المقدرة على تحليل البروتينات.

السلالة السابعة (G):

اكتشفت هذه السلالة في عام 1972م وهي من السلالات المحللة للبروتينات بشكل ضعيف لكنها غير محللة للسكريات.

ولا تنفرد كل سلالة من هذه السلالات بإفراز سم واحد فقط، بل قد تفرز سلالة واحدة أكثر من نوع واحد من السموم فمثلاً سلالة البكتيريا (C) تفرز بالدرجة الأولى سم (C_1) ومع كميات قليلة من (C_2 ، D) أو قد تفرز فقط (C_2)، كما أن سلالة D تفرز السم D بالدرجة الأولى مع كميات أقل من كلاً من السم C_1 والسم C_2.

سلالات A وأغلب سلالات B تفرز السم وتحلل الأغذية البروتينية Putrefaction وتعطي الرائحة الكريهة المميزة لتحلل البروتين خاصة في الأغذية التي تكون نسبة البروتين فيها عالية، بينما لا تظهر هذه الرائحة في الأغذية التي تكون نسبة البروتين فيها منخفضة. أما سلالات (E) وبعض سلالات (B) فهي لا تسبب ظهور هذه الروائح الكريهة، وتحلل هذه الأنواع من البكتيريا السكريات وتنتج الغاز.

كما يمكن أن تنقسم بكتيريا *Clostridium botulinum* إلى ثلاثة أقسام تبعاً لخصائصها التنموية Cultural أو الفسيولوجية Physiological وهي:-

<u>القسم الأول</u>: يشمل A إضافة إلى سلالات كلٍ من B وF التي تحلل البروتين.

<u>القسم الثاني</u>: يشمل سلالات E التي لا تحلل البروتين إضافة إلى B وF التي لا تحلل البروتين.

<u>القسم الثالث</u>: يشمل سلالات C وD التي لا تحلل البروتين وتشترك بنمط الخصائص الأيضية.

ويرجع التسمم الوشقي في الإنسان لسموم السلالات A و B وE ونادرا إلى F و G.

والسم الوشقي **Botulinal toxin** من السموم البكتيرية الخارجية **Exotoxins** (تحديداً من السموم العصبية **Neurotoxins**) وهو عبارة عن مادة بروتينية تتألف من أحماض أمينية فقط. ويعتبر من أقوى السموم التي عرفها الإنسان وقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن الجرعة اللازمة للقضاء على إنسان ضخم البنية وزنه 91 كيلوجرام تبلغ 0,2 ميكروجرام . وفي دراسة أخرى قدر أن هلاك 500 مليون نسمة يلزمه جرعة قدرها واحد جرام من السم النقي إذا ما تم توزيعه توزيعاً صحيحاً.

ويتكون السم في الغذاء الملائم لنمو البكتيريا التي تسبب التسمم الوشقي بعد فترة تتراوح بين عدة ساعات وتسعة أيام عند درجة حرارة 30°م واس هيدروجيني متعادل. ولا ينتج السم تحت درجات حرارة أقل من 3,3°م أو أعلى من 48°م، إضافة إلى أن الحموضة العالية (pH أقل من 4,5) وكذلك زيادة نسبة كلوريد الصوديوم **NaCl** (بين 5 – 10 %) أو وجود ماده نتريت الصوديوم $NaNO_2$ بنسبة 100 – 200 جرام بالمليون أو وجود سترات الصوديوم وفوسفات الصوديوم كلها تمنع أو تؤخر إنتاج السم لدرجة كبيرة. وتبطل فعالية السم إذا عرض إلى درجة حرارة 80°م ولمدة تتراوح بين عدده دقائق إلى 30 دقيقة (وبالتالي يوصى بتسخين الأغذية المعلبة منزلياً قبل تناولها) كما أن تأثير الحرارة على السم له علاقة بحموضة الوسط الذي يحتوي على السم، وحيث وجد أن السم يقاوم الحرارة كلما قلت حموضة الوسط.

ميكانيكية التسمم:

السمّ الوشقي ينتج من قبل البكتيريا على هيئة سلسلة عديد الببتيد مفردة وزنها الجزيئي حوالي 150000 دالتون، والسمّ بهذه الهيئة له فعالية منخفضة نسبيا. ويجزئ السمّ بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين المفرزة من قبل البكتيريا (أو من المحتمل بالإنزيمات المحللة للبروتين المفرزة في جسم الإنسان) لإنتاج سلسلتين من عديد الببتيد: سلسلة خفيفة وزنها الجزيئي حوالي 50000 دالتون، وسلسلة ثقيلة وزنها الجزيئي حوالي 100000 دالتون. و تبقى هذه السلاسل مرتبطة بواسطة رابطة ثنائية الكبريت **Disulfide bond**.

وقد وجد أن فعالية السم المفرز من السلالة (E) تزداد بوجود إنزيم التربسين **Trypsin** وذلك نتيجة تجزئ السم كما أُشير له أعلاه.

أن الوزن الجزيئي للسم الوشقي كبير جداً، لذلك لا يمكنه النفاذ من جدران المعدة أو الأمعاء، بل يعتقد أن نفاذة يكون عن طريق الخدوش في المعدة أو الأمعاء فقط وبالتالي يصل إلى المجاري الدموية واللمفاوية ومنها إلى الجهاز العصبي حيث يتحد مع ألياف الأعصاب ويعمل على قطع الاتصال العصبي، حيث يمنع إنتاج مركب الـ **Acetylcholine** المسئول عن حركة تقلص

وانبساط العضلات اللاإرادية التي ضمنها عضلات القفص الصدري والحجاب الحاجز ، وبعد ذلك يتوقف التنفس والقلب مما يؤدي إلى الوفاة. وقد لوحظ في التجارب التي أُجريت على بعض حيوانات التجارب أنه بعد فترة 12 ساعة تبطل فعالية 90 % من السم الذي يدخل عن طريق الجهاز الهضمي لتلك الحيوانات. وقد وجد أن فعالية السم الذي يحقن بطيات المعدة يزيد عن فعالية نفس الجرعة المعطاة عن طريق الفم لفئران التجارب بمقدار 50 – 100 مرة .

ويَعتمدُ حدوث الحالة المرضية في حالة التسمم الوشقي كليّاً على إنتاجِ السم العصبي. ويمكن أن يحدث التسمم بثلاثة طرقٍ: الشكل الأساسي للتسمّم الغذائي في البالغين ناتج عِنْ ابتلاع السمِّ في الغذاءِ المحفوظِ بشكل غير صحيح؛ وقد يكون ذلك نتيجة تلوث جرحٍ ببكتيريا *Clostridium botulinum* (لكن ذلك نادر الحدوث)، كذلك حالة التسمم الوشقي للرضّع الذي ينتج عن نمو بكتيريا *Clostridium botulinum* وإنتاجها للسمَّ في أمعاء الرضع.

<u>أعراض التسمم الوشقي:</u>

تظهر أعراض التسمم بعد تناول الغذاء الذي يحتوي على السم بفترة تتراوح بين 12 - 36 ساعة وقد تظهر الأغراض بعد فترة زمنية أقل أو أكثر من هذه الفترة وفي أحدى الحالات ظهرت الأعراض بعد 108 ساعة ولكن في أغلب الحالات تظهر الأعراض المرضية خلال 48 ساعة.

وتبدأ الأعراض المرضية على شكل تقيؤ Vomiting وغثيان Nausea وإمساك Constipation (وبسبب الإمساك يبقى السم فترة طويلة في الأمعاء حيث يمتص تدريجيا) ثم صعوبة بحركة العيون ويعاني المصاب من ازدواج الرؤية، وانتفاخ بالمعدة، والتهاب البلعوم، وجفاف في الفم، صعوبة في البلع، وتورم اللسان وأحياناً صعوبة الكلام. وعندما تكون الإصابة شديدة يصعب التنفس ويتوقف القلب عن العمل. تأثير السم يكون في منع تكوين مركب الاستيل كولين Acetylcholine الذي يعتبر مركب أساسي لقيام الجهاز العصبي بوظائفه. وفي أغلب الحالات تنتهي بالوفاة.

<u>علاج حالات التسمم الوشقي:</u>

بعد تناول السم مع الغذاء ووصوله إلى الدم وظهور الأعراض يكون من الصعب اتخاذ إجراءات علاجية فعالة ولكن يجب على الفور (ودون انتظار لنتيجة التشخيص المختبري لنوع السم) أن يعطى المريض بواسطة الوريد ترياق Antitoxin ثلاثي المفعول (المصل المناعي المتعدد) أي المحضر ضد الأنواع الثلاثة من السم (A و B و E) وبعد تعيين نوع السم (نتيجة التشخيص المختبري) يعطى المصل المضاد النوعي بواسطة الوريد مع إجراء عملية غسل الجهاز الهضمي لغرض إزالة ما قد تبقى من السم كما وجد أن التنفس الاصطناعي والراحة والهدوء ذو

فوائد كبيرة للمريض. وقد يعطى المريض مضادات حيوية لغرض حمايته من احتمال زيادة تكاثر بكتيريا التسمم وإفرازها للسم في جسمه وقد وجد أن إعطاء المصل المضاد للسم في وقت مبكر وبالكميات الكافية يكون ذو فائدة كبيرة. ففي الاتحاد السوفييتي السابق حدثت 227 إصابة بالسم الوشقي وقد أعطى المصل المضاد إلى 146 شخص منهم وكانت النتيجة أن توفي فقط 18 % منهم ، بينما لم يعطى المصل المضاد لـــ 79 شخص الآخرين من بين المصابين وقد بلغت نسبة الوفيات بينهم 93 %.

<u>الوقاية من التسمم الوشقي:</u>

1- عدم استهلاك الأغذية المعلبة إلا من مصادر موثوق بها ورفض الأغذية المعلبة منزلياً.

2- رفض استهلاك الأغذية المعلبة التي تظهر عليها علامات الفساد أو التلف.

3- تجنب استهلاك الأغذية المطبوخة والمتروكة لفترة طويلة تحت الظروف الاعتيادية.

4- غلي الأغذية التي يشك في سلامتها مدة لا تقل عن 15 – 30 دقيقة قبل تناولها.

2- بكتيريا *Staphylococcus aureus*:

بكتيريا موجبة لصبغة جرام، و تتجمع على هيئة عناقيد ولهذا تُسمى بالمكورات العنقودية. تنمو هوائياً وهي أيضاً لا هوائية اختيارية، غير متحركة وغير مكونة للجراثيم وتُفرز إنزيم الكاتليز. و تظهر مستعمراتها باللون الذهبي عادة ولكن يتفاوت لون الصبغة بين اللون البرتقالي والأبيض. كما يحتوي عدد كبير من سلالات البكتيريا على محفظة يمكن أن تقسم على أساسها إلى ثمانية أنواع سيرولوجية 8 capsular serotypes. وتخمر البكتيريا العديد من السكريات منتجة حامض دون أن تطلق غازاً وتفرز إنزيم الكاتليز وتميع الهلام وهي تحلل الدم. كما تنمو هذه البكتيريا على وسط غذائي يحتوي على 10 % من كلوريد الصوديوم وهو وسط لا تنمو عليه البكتيريا السالبة لصبغة جرام وبعض البكتيريا الموجبة لصبغة جرام بسبب تركيزه الملحي العالي. وتستغل هذه الخاصية في عزل هذه البكتيريا بين خليط من الأنواع المختلفة.

وهذه البكتيريا مرضية قد تتواجد على جسم الإنسان بشكل سلمي دون أن تسبب عدوى أو أمراضاً وهي ظاهرة تعرف علمياً بالتعايش البكتيري Commensalism، وأبرز أماكن تواجدها في تجويف الأنف، ومنطقة الإبطين وما بين الفخذين. وعند حدوث أي تشققات أو خدوش بالجلد، فإن هذه البكتيريا قد تتسبب في بعض الالتهابات كالقروح، أو الدمامل وخاصة في المناطق المشعرة، مثل الرأس، والرقبة، وتحت الإبطين ومنطقة العانة، وعادة ما تبقى تلك العدوى والالتهابات موضعية لا تنتقل إلى باقي أعضاء الجسم نظراً لإنزيمات وإفرازات خاصة مصدرها تلك البكتيريا تعمل على حوصلة تلك الالتهابات.

وتختلف الأمور تماماً عندما تصيب تلك البكتيريا ذوي المناعة الضعيفة مثل حديثي الولادة، مثل الأطفال، أو كبار السن، أو المرضى بالداء السكري، أو مرضى زراعة الأعضاء، أو المرضى بالسرطان، عندها تتسبب تلك البكتيريا في إصابات خطيرة حيث تنفذ إلى الدم وسائر أعضاء الجسم مسببة حدوث تسمم الدم Septicemia أو التهابات رئوية، أو التهابات صمامات القلب، أو التهابات بالعظام أو غيرها، وقد تؤدي إلى الوفاة أحياناً.

الأنزيمات والسموم التي تفرزها المكورات العنقودية الذهبية:

1- إنزيم التجلط (التخثر) Coagulase:

إنزيم يُخثر بلازما الدم، وهذه الصفة من أهم الصفات التي تفرق بين المكورات العنقودية الممرضة وغير الممرضة ولهذا تعرف المكورات العنقودية الذهبية بالمكورات العنقودية المفرزة للكواجيوليز Coagulase-positive staphylococci أما غير المفرزة لهذا الإنزيم فتعرف بالمكورات العنقودية غير المفرزة للكواجيوليز Coagulase-negative staphylococci. وجدير بالذكر أن هناك نوعان من المكورات العنقودية مفرزة لإنزيم الكوأجيوليز بجانب المكورات العنقودية الذهبية هما المكورات العنقودية الوسطى *Staphylococcus intermedius*

والمكورات العنقودية الخنزيرية ***Staphylococcus hyicus*** اللاتي يتم عزلهن من الحيوانات (إلا أن كلاهما لا يخمر المانيتول). وتكمن أهمية أنزيم الكوأجيوليز في أنه يغلف المكورات بالفايبرين مانعاً بذلك الخلايا البالعة من التهامها. وهناك نوعان من هذا الإنزيم: المقيد والطليق.

أ- الكوأجيوليز المقيد **bound coagulase: (clumping factor)** وهو يوجد على جدار الخلية الخارجي في معظم أنواع المكورات العنقودية الذهبية ويتفاعل مع الفيبرينوجين مسببا تجمع المكورات العنقودية وذلك كما يحدث في اختبار الكوأجيوليز باستخدام الشريحة الميكروسكوبية **slide coagulase test** .

ب- الكوأجيوليز الطليق **free coagulase**: وهو يفرز أثناء نمو البكتيريا خاصة خلال الطور اللوغاريتمي ويسبب تجلط البلازما وذلك كما يحدث في اختبار الكوأجيوليز باستخدام الأنبوبة **tube coagulase test**.

2- إنزيم **Hyaluronidase**: وهو إنزيم يُفكك حمض الهيالورينيك **Hyaluronic acid** المكون الأساسي للأنسجة الضامة مما يسهل من عملية انتشار المكورات بالأنسجة.

3- إنزيم حال للـ **DNA**: وهو إنزيم يحلل الحامض النووي مؤدياً إلى أضرار بالأنسجة المختلفة.

4- إنزيم **Staphylokinase**: وهو إنزيم يُفكك الخثرات المتكونة من الفيبرين **Fibrinolysin** .

5- إنزيمات أخرى تفرزها المكورات العنقودية الذهبية: إنزيم الفوسفاتيز وإنزيم اللايبيز وإنزيم البنسيليز الذي يكسر المضاد الحيوي البنسيلين فيبطل مفعوله ولهذا لا يمكن الاستفادة منه كعلاج للسلالات المفرزة للأنزيم.

6- بروتين **(A)**: وهو يوجد في جدار الخلية ويتحد بصورة غير نوعية مع جزء **Fc** المستقبل من الأجسام المضادة مانعاً بذلك وظيفة الأجسام المضادة في التخلص من البكتيريا ويمنع البلعمة.

7- مواد حالة للكريات البيضاء **Leucocidine**: وهي تحطم الخلايا البالعة والملتهمة وتلعب دوراً في تثبيط عملية البلعمة.

8- السم المقشر لطبقة الجلد **Epidermolytic toxin**: وهو سم خارجي يتكون من مواد بروتينية ويسبب تقشر الطبقة الخارجية للجلد في الأطفال حديثي الولادة، ونادراً في البالغين المصابين بنقص في المناعة. وهناك نوعان من هذا السم ، سم **A** و **B (ETA & ETB)**.

9- حالات الدم **Haemolysins**: وهناك أربعة أنواع من هذه السموم، ألفا وبيتا وجاما ودلتا، وهي محللة لخلايا الكرات الدموية الحمراء والصفائح الدموية وسامة لبعض خلايا الأنسجة المزروعة. كما أن سم ألفا يحلل الكرات الملتهمة الكبيرة.

10- السم المسبب لأعراض الصدمة السمية **Toxic Shock Syndrome Toxin**: وهو مادة بروتينية رافع لدرجة حرارة الجسم.

11- السم المعوي Enterotoxin: وهو من السموم الخارجية، ذو طبيعة بروتينية، مقاوم للحرارة وإنزيمات الجهاز الهضمي. يسبب السم المعوي تسمماً غذائياً يظهر على هيئة إسهال شديد وقيء، وُيفرز من قبل عدد كبير من المكورات العنقودية الذهبية في الطعام الملوث بها كالحلويات والمعجنات ومشتقات الألبان والمايونيز واللحوم الملوثة. وهناك (حتى الآن) عشرة أنواع مصلية لهذا السم هي A و B و C_1 و C_2 و C_3 و D و E و F و G و H، وهذه السموم مقاومة للإنزيمات المحللة للبروتينات ومقاومة للحرارة حيث وجد أنها تتحمل حرارة تصل إلى درجة الغليان لمدة 30 دقيقة، ويعتبر النوع المصلي B أكثرها مقاومة حرارية.

<u>أمراض المكورات العنقودية الذهبية:</u>

تظهر أمراض المكورات العنقودية الذهبية على هيئة أمراض سطحية وأمراض جهازيه وتتمثل الأمراض السطحية في التهابات الجلد، والجروح المختلفة، وأما الأمراض الجهازية فتظهر نتيجة لدخول المكورات العنقودية الذهبية في الدم ثم للأجهزة الداخلية مسببة أياً مما يلي:- تسمم الدم Septicaemia، التهاب السحايا Meningitis، التهاب العظام Osteomylitis التهاب المفاصل Arthritis التهاب الكلية Nephritis، الالتهاب الرئوي Pneumonia، التهاب الجهاز التنفسي العلوي عامة، إضافة إلى التسمم الغذائي الناتج عن ابتلاع طعام يحتوي على السم المعوي الملوث بسلالة فرزة لهذا السم، ولهذا تظهر أعراض التسمم الغذائي الناتج عن هذه البكتيريا بعد فترة قصيرة تتراوح بين ساعتين إلى ست ساعات. وعادة ما يتلوث الطعام من الأشخاص الحاملين للمكورات والمتداولين للأطعمة.

<u>التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية Staphylococci Food Poisoning:</u>

يحدث هذا النوع من التسمم عن طريق تناول غذاء يحتوي على السم المعوي والذي يتكون في الغذاء نتيجة نمو سلالات معينة من بكتيريا *Staphylococcus aureus* وهو يسبب التهاب في بطانة المعدة والأمعاء. ومن المشاكل المتعلقة بهذا النوع من التسمم أن الأغذية التي قد تحتوي على مئات الملايين من البكتيريا المسببة للتسمم في الجرام الواحد لا يظهر عليها تغيرات واضحة في النكهة والطعم والمظهر الخارجي ، بذلك تكون الأغذية الجاهزة للاستهلاك والمتروكة فترة طويلة تحت الظروف الملائمة لنمو البكتيريا وإفراز السم تكون مصدر خطر لتسمم الإنسان. وتبدأ أعراض هذا المرض بعد تناول الأكل الملوث بساعتين إلى أربع ساعات على شكل شعور بغثيان وقيء وتقلصات في الأمعاء وإسهال. والأعراض في معظم الحالات تختفي تلقائياً خلال أربع وعشرين ساعة. ولكن في بعض الأحيان خاصة عند كبار السن أو المريض الذي يعاني من أمراض أخرى قد تكون حالة تسمم الطعام هذه تشكل خطورة على حياة المريض.

مصادر التلوث بالتسمم الغذائي بالمكورات العنقودية:

إن أهم مصدر لسلالات بكتيريا *Staphylococcus aureus* المسببة للتسمم الغذائي هو الإنسان عن طريق اليدين التي غالباً ما تحمل ملايين البكتيريا، وعندما يتداول العاملون الأغذية عن طريق تصنيعها وتحضيرها يعني ذلك نقل أعداداً كبيرة من تلك البكتيريا في تلك الأغذية. ووجود الجروح الملتهبة أو الدمامل في أيدي العاملين يزيد من نسبة تلوث تلك الأغذية، إضافة إلى ذلك تنتقل البكتيريا عن طريق عطس وسعال الإنسان حيث تواجد البكتيريا في تجويف الفم المجاري التنفسية الأشخاص خاصة أولئك الذين في يعانون من الزكام والتهابات البلعوم والحنجرة، هذا مع العلم أن نسبة 30 – 50 % من الأشخاص الاعتياديين يحملون البكتيريا.

وتتلخص مصادر انتقال بكتيريا *Staphylococcus aureus* فيما يلي:

1- الإنسان: تتواجد البكتيريا في الأنف والحنجرة والأيدي والجلد.....الخ.

2- الحيوانات: تتواجد البكتيريا في ضرع المواشي المصابة بمرض التهاب الضرع والدواجن والخنازير وحيوانات الزينة.

3- المحيط الخارجي: تتواجد البكتيريا في الهواء الماء الغذاء.....الخ.

وقد وجد أن البكتيريا المسئولة عن التسمم العنقودي الذهبي تنمو في ظروف واسع بينما إنتاج السم يكون في ظروف ملائمة أضيق وان نسبة الأوكسجين وتواجد البكتيريا المنافسة الأُخرى تؤثر على إنتاج السم أكثر من العوامل الأُخرى مثل درجات الحرارة والحموضة والرطوبة وغيرها من العوامل.

الظروف الواجب توفرها لحدوث التسمم: يحدث التسمم عندما تتوفر الظروف الاساسية التالية:

أ- وجود سلالة البكتيريا التي لها خاصية إفراز السم المعوي في الأغذية أثناء إنتاجها أو تصنيعها أو تداولها.

ب- أسلوب أو وسيلة مباشرة أو غير مباشرة تنتقل بها البكتيريا من مصدرها إلى الغذاء.

ج- تلوث الأغذية بآلاف البكتيريا بكل جرام أو مليلتر.

د- مقاومة البكتيريا للعوامل البيئية مثل بعض أنواع البكتيريا التي تنافسها على البقاء ودرجات الحرارة وغير ذلك من العوامل، قبل إنتاجها الكميات الكافية من السم.

هـ- ملائمة المادة الغذائية لاستمرارية نمو وتكاثر البكتيريا.

و- بقاء الغذاء فترة كافية تحت درجة حرارة ملائمة لتكاثر البكتيريا وإفراز السم.

ز- تناول الإنسان الغذاء الذي يحتوي كمية كافية من السم.

أعراض التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية:

تبدأ أعراض التسمم الغذائي بعد فترة تتراوح بين ثلاثون دقيقة إلى بضعة ساعات وغالباً ما تظهر بعد مرور 2 – 4 ساعات بعد تناول الأغذية التي تحتوي على السم المعوي. وتبدأ الأعراض على هيئة زيادة في سيلان اللعاب Salivation ويلي ذلك غثيان Nausea ثم تقيؤ vomiting والآم تشنجية Cramps في المعدة والأمعاء ويلي هذه الأعراض إسهال diarrhea وإنهاك في القوى. وقد تكون الحالة المرضية حادة أو خفيفة يعتمد ذلك على كمية السم المتناول وعلى مناعة الشخص المصاب، وفي الحالات الحادة يحدث جفاف في سوائل الجسم وقد يقترن مع الإسهال والتقيؤ خرج الدم وآلام شديدة في الرأس وقشعريرة ولكن بدون حمى. وفترة المرض عادة ما تستمر لساعات ولا تطول أكثر من يوم أو يومين في بعض الحالات النادرة وغالبا ما يشفى المريض بدون مضاعفات مرضية جانبية.

الوقاية والعلاج:

أ- خزن الأغذية خاصة الجاهزة منها تحت درجات حرارة لا تزيد عن 6°م في حالة التأخر عدة ساعات عن تناولها لان تركها تحت الظروف الملائمة يجعل البكتيريا تنمو فتفرز السم.

ب- تسخن الأغذية المتهمة بنقل التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية بحيث تصل درجة حرارة أبرد نقطة بداخلها إلى 68,3°م أو أكثر أثناء تحضيرها.

ج- عدم ترك الأغذية المراد تصنيعها تحت درجات الحرارة الملائمة لنمو البكتيريا وتكوين السم في تلك الأغذية وبالتالي يكون من الصعب التخلص من السم أثناء تصنيع الأغذية ومعاملتها تحت درجات حرارة لا تبطل مفعول السم.

د- النظافة الشخصية للأشخاص العاملين في تصنيع وتحضير وتداول الأغذية، حيث يجب تنظيف وتعقيم الأيدي قبل البدء بتداول وتماس الأغذية. كذلك على العاملين في مجالات الأغذية عدم تنظيف انوفهم والسعال أثناء العمل.

ه- عدم السماح لمن لديه جروح أو خدوش ملتهبة أو دمامل (خاصة على أيديهم) من تماس الأغذية وذلك لمنع انتقال البكتيريا التي تسبب التسمم الغذائي من الانتقال إلى تلك الأغذية.

لا توجد عقاقير طبية فعالة لإيقاف التسمم الغذائي بالمكورات العنقودية بعد ظهور أعراضه. وبما أن الخطر في هذا النوع من التسمم هو احتمال حدوث الجفاف نتيجة لفقد الجسم للسوائل عن طريق التقيؤ والإسهال وبذلك يختل التوازن المائي والملحي في الجسم، لذا من الممكن حقن المصاب بمحاليل ملحية بنسب وكميات تتفق مع العمر وحِدة التسمم وحسب ما يقترحه الطبيب المختص. وفي هذا النوع من التسمم الغذائي لا يكون ضرورياً غسل المعدة.

3- بكتيريا *Bacillus cereus*:

بكتيريا عصوية الشكل كبيرة، موجبة لصبغة جرام، مكونة للأبواغ، وموقع البوغ في الوسط أو على أحد الطرفين، متحركة بواسطة أسواط محيطية، وبعضها غير متحرك، هوائية وتنمو ببطء في الظروف اللاهوائية. درجة حرارة نموها المثلى بين 28° - 35°م، لكنه يمكن أن تنمو في درجات حرارة بين 7° - 48°م وهذه الخاصية جعلت هذه البكتيريا تجمع بين قدرتها على مقاومة الحرارة (خصوصاً كونها مكونة للأبواغ) وكذلك تحمل درجات الحرارة المنخفضة مما جعلها تتسبب في تلوث العديد من الأغذية المعاملة بحرارة البسترة والمحفوظة بالتبريد كالحليب المبستر. ففي هولندا تم دراسة تلوث الحليب ببكتيريا *B. cereus*، وكانت حوالي 40 % من السلالات المعزولة أظهرت مقدرة على النمو على درجة حرارة 7°م. ووجود هذه البكتيريا المتحملة للبرودة في الحليب الخام سيؤدي إلى وجودها في الحليب المبستر وذلك نظراً لأن البكتيريا تمتلك خاصية المقاومة للحرارة، وبما أن الحليب سيُخزن عند درجات حرارة منخفضة فإن هذه البكتيريا المتحملة للبرودة سوف تنمو وتتسبب في تلف الحليب المبستر المحفوظ بالتبريد، فقد وجد أن للبكتيريا علاقة ببعض العيوب التي تكون في الحليب ومنتجاته، مثل النكهة غير المرغوبة، التخثر الحلو والطعم المر المتكونتين بفعل إنزيماتها المحللة للبروتين.

وتنتشر البكتيريا على نطاق واسع في الطبيعة فهي تتواجد في التربة والمياه والهواء والنباتات والأغذية. ولقد تم عزل حوالي 40 سلالة من هذه البكتيريا من مختلف المصادر. وقد كانت التقارير (قديماً) تشير إلى أن هذه البكتيريا تعتبر عديمة الضرر، رمية التغذية، غير أن عدد كبير من التقارير اللاحقة (في الخمسينيات والستينيات من القرن الماضي) أكدت مسؤوليتها عن العديد من حالات التسمم الغذائي الجماعي للإنسان. ففي أوائل الخمسينات نشرت تقارير عن أربع حالات تسمم جماعي في النرويج شملت 600 شخصاً، في احد حالات التسمم تلك والتي شلت 80 شخصاً تناولوا وجبة غداء تتكون من اللحم والخضار والحلوى المصنوعة من الشكولاتة والتي تم تهيئتها من اليوم السابق وتم تركها تحت الظروف الاعتيادية، ومن بين الـ 80 شخصاً الذين تناولوا وجبة الغداء حدث تسمم لـ 61 شخصاً ولم يحدث التسمم لـ 19 شخصاً الآخرين وذلك بسبب عدم تناول أحدى عشر شخص منهم الحلوى والثمانية الباقون تناولوا الحلوى بكمية ضئيلة. ظهرت الأعراض المرضية بعد عشر ساعات من تناول الغداء. أما الذين تناولوا الغداء بعد فترة ساعتين ونصف الساعة عن رفاقهم فقد ظهرت لهم الأعراض المرضية بعد ساعتين ونصف الساعة من ظهور الأعراض على الذين تناول الوجبة الأولى وكانت حالة التسمم لديهم اشد. شملت

الأعراض المرضية آلام معدية إضافة إلى إسهال مائي غزير، لكن التقيؤ كان نادراً، وقد استمرت فترة الأعراض المرضية حوالي 12 ساعة. لقد شخصت الحلوى بأنها المسئولة عن إحداث التسمم حيث وجد عدد البكتيريا بالمليلتر الواحد يتراوح بين 2,5 × 10^7 و 1,1 × 10^8، ولم تظهر على تلك الحلوى أي تغيرات غير مرغوبة من حيث الطعم والرائحة والصفات الطبيعية الأُخرى. ومنذ الخمسينيات حدثت حالات تسمم جماعي متعددة بهذه البكتيريا في عدد من أقطار العالم، فقد ظهر في المجر في الفترة ما بين 1960 – 1968 أن *B. cereus* سببت تسمماً غذائياً نتيجة تناول وجبات من كفتة اللحم، وفي الولايات المتحدة في عام 1969 نتيجة تناول مهروس البطاطس، وفي بريطانيا عام 1971 نتيجة تناول أرز مطبوخ، وفي 1975 نتيجة تناول قشدة مبسترة.

ونظراً لأن *B. cereus* تتجرثم بسهولة في الغذاء، لذلك فإنها تقاوم المعاملة الحرارية، وبالتالي تنمو الأبواغ وتتكاثر وتسبب التسمم في الأغذية التي تتواجد بها. ولذلك فوجود أعداد كبيرة من البكتيريا (تفوق 10^6 خلية/جرام) في أي غذاء يشير إلى وجود خطر محتمل على الصحة. وقد أشارت العديد من التقارير أن بكتيريا *B. cereus* تنتج سموم من Enterotoxin على الوسطين (Brain-Heart Infusion (BHI و Proteose Peptone media، وعند حقن هذا السم لفئران التجارب في الوريد أدى إلى موتها. هذا السم حساس تجاه إنزيم التربسين، كما أنه حساس للحرارة ويبطل مفعوله عند معاملته حرارياً بدرجة 65°م لمدة 5 دقائق. وتتباين سلالات البكتيريا في شدة إنتاجها لهذا السم الذي يتراوح وزنه الجزيئي بين 55000 – 60000 دالتون. وقد تم التعرف على نوعين التسمم الغذائي الذي تسببه بكتيريا *B. cereus*، هما:

1 - تسمم القيء Emetic poisoning: يحدث هذا التسمم عقب تناول أغذية ملوثة بسم البكتيريا التي تكون قد أفرزته نتيجة نموها في الأغذية نتيجة توفر الظروف الملائمة لذلك، وهذا التسمم يعتقد أنه سببه ببتيد منخفض الوزن الجزيئى، وهو مقاوم للحرارة، حيث يمكن أن يقاوم درجة حرارة 121°م لمدة 90 دقيقة. وأعراض هذا التسمم توازى أعراض التسمم بسم بكتيريا *Staphylococcus aureus*، حيث يتميز بحالة من الغثيان والقيء، خلال 0,5 – 6 ساعات من تناول الطعام الملوث، وقد تصاحب الأعراض بحدوث مغص و/أو إسهال أيضا. ومدة الأعراض تقل عن 24 ساعة بصفة عامة. والأغذية الناقلة لهذا السم هي الحبوب الغذائية وخاصة الأرز، القشدة المبسترة، حلوى الأرز بالحليب، المكرونة، مهروس البطاطس والخضراوات.

2- تسمم الإسهال Diarrheal poisoning: يحدث هذا التسمم نظراً لأن الأبواغ أكثر مقاومة للحرارة من الخلايا الخضرية، فإنها تقاوم عملية الغليان التي تتعرض لها الأغذية المطهية، وتبقى في هذه الأغذية. تستطيع هذه الجراثيم أن تنمو في القناة الهضمية بعد

تناول الغذاء الملوث، حيث يتكون السم. ان السبب الأساسي في حدوث الإسهال هو اختلال في وظيفة الخلايا الطلائية للأمعاء يحدث بسبب بروتين ذى وزن جزيئى كبير، مما يعمل على زيادة خروج السوائل والأملاح. وأسلوب تأثير هذا السم مماثل لأسلوب سم بكتيريا *Vibrio cholerae*، حيث يسبب إفراز السوائل في تجويف الأمعاء لتنشيط إنزيم **Adenylate Cyclase**، مما يؤدي لحدوث الإسهال، وهذا السم غير مقاوم للحرارة، وينخفض نشاطه بدرجة كبيرة عند درجات حرارة أعلى من 45°م. وأعراض هذا النوع من التسمم تحاكي أعراض تسمم بكتيريا *Clostridium perfringens*، ويبدأ الإسهال المائي والمغص والألم بعد 6 – 15 ساعة من تناول الطعام الملوث. وقد يصاحب الإسهال غثيان، إلا أن القيء نادر الحدوث. وفى معظم الحالات تستمر الأعراض 24 ساعة. أماالأغذية التي تتسبب بهذا النوع من التسمم هي اللحم المفروم المطهي، الخضراوات، المرق، السجق، الحليب، البودنج، ووجبات الحبوب الحاوية ذرة أو نشا ذرة.

وحديثاً تم الكشف من قِبل **Lund** وأخرون (2000م) عــن سُم خَلَوِيّ جديد من بكتيريا *B. cereus* يعتقد أنه يتسبب في حدوث اِلْتِهابُ الأَمْعاء نَّخْرِيٌّ (تَآكُلي) **Necrotic Enteritis** محلل لكريات الدَّم **Hemolytic**، وقد نُشر ذلك في مجلة **Molecular Microbiology** المجلد 38 الإصدار 2. وقد عُزل هذا السُم الخَلَوِيّ من سلالة من بكتيريا *B. cereus* تسببت في حدوث تسمم غذائي حاد أودى بحياة ثلاثة اشخاص. وقد شُخص هذا السم كبروتين وزنه الجزيئي 34000 دالتون.

<u>الوقاية من التسمم الغذائي ببكتيريا *Bacillus cereus*:</u>

إن بكتيريا *B. cereus* تنتشر على نطاق واسع في الطبيعة فهي تتواجد في التربة والمياه والهواء والنباتات والأغذية، مما يجعل السيطرة عليها أمراً غير ممكن، ولكن هذه البكتيريا غير خطرة عند دخول أعداد قليلة منها إلى الجهاز الهضمي، وبالتالي فإن أساس الوقاية من هذه البكتيريا هو عدم السماح لأبواغها بالنمو والتكاثر في الأغذية المعدة للاستهلاك. إن عملية الطبخ الفعالة تقضي على أبواغ البكتيريا وخلاياها الخضرية. وعند تناول الغذاء بعد عملية طبخ الأغذية بفترة وجيزة لا يكون للبكتيريا *B. cereus* القدرة على إحداث تسمم غذائي. ولكن ونتيجة لعدم تعرض الغذاء إلى معاملة حرارية كافية لهلاك أبواغ البكتيريا أثناء الطبخ تبقى أبواغ البكتيريا حية وعندما يترك الغذاء لفترات طويلة تحت الظروف الاعتيادية تنمو هذه الأبواغ إلى خلايا خضرية وتبدأ بالتكاثر وتصل إلى أعداد هائلة في الأغذية، وعند تناول تلك الأغذية بدون إعادة طبخها تدخل الجهاز الهضمي وتسبب التسمم الغذائي.

لذا يكون من المهم إتباع ما يلي:

1- تطهى الأغذية خاصة التي تحتوي على اللحوم والأرز والخضر طهياً جيداً.

2- يستحسن استهلاك الأغذية بعد فترة وجيزة من الانتهاء من طبخها.

3- يخزن الغذاء في درجات حرارة منخفضة بعد الطهي بفترة وجيزة عند عدم استهلاكه في تلك الوجبة ولا يترك تحت الظروف الاعتيادية لمدة طويلة.

4- يعاد طهي الأغذية جيدا عند تركها لفترة ساعات طويلة تحت الظروف الاعتيادية (درجات حرارة بين 15° - 50°م).

5- في المؤسسات التي تكون فيها التغذية جماعية من الضروري الإبقاء على تسخين الأغذية مستمر أثناء الوجبات الطويلة.

4- بكتيريا *Clostridium perfringens*:

توجد هذه البكتيريا (والتي كانت تسمى *Clostridium welchii*) في كل مكان في الطبيعة، فهي توجد في الماء والتربة وأمعاء الإنسان والحيوان، وتسبب التعفن وانتفاخ الجثث بعد الوفاة، إذ تنتقل من الأمعاء إلى جميع الأنسجة الداخلية مسببة حالات التعفن والانتفاخ هذه. ويوجد من هذه البكتيريا أنواع مرضية وأخرى غير مرضية، والأنواع المرضية من هذه البكتيريا تسبب أمراض متعددة عند الإنسان والحيوان، وأهم الأمراض التي تسببها للإنسان هي:-

1 - الموت الغازي أو الغرغرينا الغازية Gas Gangrenes.

2 - التسمم الغذائي Food Poisoning.

وتقسم هذه البكتيريا إلى ستة أنواع مصلية. وتتميز هذه البكتيريا بأنها عصوية قصيرة سميكة، موجبة لصبغة جرام، غير متحركة. وموقع البوغ فيها وسطي. وهي كباقي أنواع بكتيريا الكلوستريديوم لا هوائية إجباراً ودرجة الحرارة المثلى لنموها 37°م، تنمو على بيئة اللّحم المطبوخ حيث تعطي تعكراً كثيفاً مع إنتاجها لكميات كثيفة من الغاز خلال 18 - 24 ساعة. كما أنها تخمر معظم السكريات المكونة كمية كبيرة من الغاز مما يعرف بالتخمر العاصف.

السموم الخارجية لبكتيريا *Clostridium perfringens*:

تنتج الأنواع المتعددة من هذه البكتيريا أنواع مختلفة من السموم الخارجية ولكل من هذه السموم تأثيره الخاص وتركيبه الكيميائي ومولد الضد الخاص به ومن هذه السموم ما يلي:-

1 - السم ألفا α Toxin: تقسم بكتيريا *Clostridium perfringens* إلى ستة أنواع مصلية من A وحتى F على أساس مقدار كمية السم ألفا (α Toxin) الذي ينتجه كل نوع. والسم ألفا هو العامل المسبب لتسمم الدم المرافق لحالات الموت الغازي (الغرغرينا الغازية)، وبسبب هذا السم تحلل لمركب الليسثين الذي يعتبر مركب هام وأساس في غشاء الخلية، كما يحلل ويؤثر على بعض التراكيب الخلوية مثل الميتوكوندريا. ويفرز هذا السم من جميع أنواع هذه البكتيريا.

2 - السم بيتا β Toxin: يسبب تحلل الدم ويؤثر على النسيج لكنه لا يحلل الليسثينات. ويفرز هذا السم من قبل الأنواع B و C و F.

3 - السم إبسيلون υ Toxin:- ويرتبط التأثير المميت لهذا السم بوجود وسط قلوي وإنزيمات محلله للبروتين، ويفرز هذا السم من قبل الأنواع B و D.

الأمراض والأعراض التي تسببها بكتيريا لبكتيريا *Clostridium perfringens*:

كما سبقت الإشارة فأن بكتيريا *C. perfringens* تسبب عده أمراض عند الإنسان أهمها:-

أولاً- الموت الغازي Gas Gangrenes:-

يحدث نتيجة تلوث الجروح أو الجلد المكشوط بجراثيم البكتيريا الموجودة في التربة أو البراز.........الخ، ونتيجة لهذا التنوع في التلوث فأن حالات الإصابة بالموت الغازي عادة ما تكون بسبب عدوى مختلطة. فبالإضافة إلى الـ*C. perfringens* فأن الموت الغازي يمكن أن يحدث بواسطة أنواع أخرى من الـ *Clostridium* مثل *C. oedematiens* و *C. septicum* و*C. histolyticum*. ومعظم حالات هذا المرض تظهر في الحروب وحوادث السيارات وفي العمليات الجراحية وخاصة بعد عملية جراحة الرحم حيث أن وجود بكتيريا الـ Clostridium في الجهاز التناسلي في الأحوال الطبيعية يسهل عملية العدوى للرحم بعد الولادات المتعسرة.

وحالما تصل الجراثيم إلى الجروح حيث تكون البيئة الجيدة والمناسبة لنموها فأنها تتكاثر وخصوصاً في الجروح العميقة الحاوية على أنسجة ميتة. وهكذا فأن عملية التكاثر تؤدي إلى إنتاج أحماض وغازات وكذلك ينخفض الرقم الهيدروجيني pH في هذه الأنسجة ويساعد على حدوث ذلك واستمراره توفر ظروف لا هوائية، مما يؤدي إلى تحرر السموم من هذه البكتيريا التي تقوم بعد ذلك بمهاجمة الأنسجة السليمة وتخربها.

وأعراض هذا المرض تظهر بعد يوم إلى ثلاثة أيام من العدوى وتتميز بتكوين غازات وفرقعة في النسيج تحت الجلد والعضلات مع انطلاق رائحة كريهة. وسريعاً ما تتلف الأنسجة وترتفع درجة حرارة المريض ويصاب بتسمم دموي، تتبعه صدمة، مما يؤدي به في النهاية إلى الوفاة. ويمكن في بعض الحالات ألا تتسبب إلا في التهاب الجلد أو التهابات موضعية في الرئة أو الزائدة الدودية أو العظام.

ثانياً - التسمم الغذائي Food Poisoning:-

إذا انتقلت بكتيريا *C. perfringens* بواسطة الغذاء فأنها تتسبب في حدوث عدوى غذائية على هيئة تشنجات ومغص باطني وإسهال وأحيانا حدوث قيء، ونادراً ما يؤدي هذا النوع من التسمم إلى الوفاة. ويكون السبب في حدوث حالة التسمم الغذائي سموم معوية Enterotoxins تفرزها هذه البكتيريا.

من بين السلالات الست للبكتيريا فأن السلالة (A) والسلالة الثالثة (C) لهما علاقة في حدوث التسمم الغذائي لدى الإنسان أما السلالات الأربع الأُخرى فلها علاقة بحدوث حالة التسمم الغذائي لدى الحيوانات مثل الأغنام والأبقار.

وتعتبر السلالة (A) من بكتيريا *C. perfringens* المتسبب الرئيسي في حدوث أكثر حالات التسمم الغذائي للإنسان ويكون شدة هذا التسمم أقل من حالات التسمم التي تسببها السلالة (C) من هذه البكتيريا. التي على الرغم من أنها قليلة الانتشار مقارنة بالسلالة (A) إلا أن حاله التسمم بها تكون أشد بكثير، كما أنها أكثر مقاومة للحرارة من السلالة (A)، إضافة إلى أنها تفرز نوعين من السموم هما ألفا α وبيتا β مقارنة بالسلالة (A) والتي تفرز السم ألفا α فقط.

وعموماً السم المعوي الذي تفرزه بكتيريا *C. perfringens* حساس للحرارة حيث يبطل مفعولة بدرجة حرارة 60°م لمدة 4 دقائق وأقل أو أصغر جرعة قاتلة من هذا السم MLD عالية حيث تبلغ 2000 ملجم للفأر الواحد وتسبب في حدوث الوفاة لحيوان التجارب خلال 20 دقيقة.

ويحدث التسمم الغذائي للإنسان بعد تناوله أغذية تحتوي على خلايا خضرية من البكتيريا وبأعداد كبيرة تتراوح بين 10^6 – 10^7 خلية خضرية / جرام من الغذاء.

وبعد تناول هذه الخلايا الخضرية يحدث تكوين الأبواغ داخل الأمعاء الدقيقة للإنسان أو الحيوان ويتكون السم المعوي أثناء مراحل تكوين الأبواغ داخل أمعاء المضيف ولا يتكون خارجها إلا في حاله استخدام بعض الأوساط الخاصة لتكوين الأبواغ في بعض سلالات البكتيريا.

ويتم خروج السم من الأبواغ بعد تحلل الجدران الخارجية لها في داخل الأمعاء الدقيقة ويحدث تجمع للسوائل بين 8 - 14 ساعة من الأغذية الملوثة وتستمر لمدة 12 - 24 ساعة، وعادة بدون حدوث مضاعفات مرضيه إلا في حاله أصابه الأطفال والمسنين فقد تطول فترة المرض، وأهم الأعراض الآم معدية ومعوية خفيفة إلى حادة، مع حدوث إسهال وإنهاك جسمي.

الوقاية والعلاج:

أولاً العلاج في حاله الموت الغازي أو الموت الغازي أو الغرغرينا الغازية Gas Gangrenes:-

لا يكون إلا باستئصال الأنسجة التالفة من الجروح وحقن المصاب بالمصل المضاد للسموم التي تفرزها بكتيريا *C. perfringens* بالإضافة إلى العلاج بالمضادات الحيوية المناسبة. ويمكن منع العدوى بشكل كبير وذلك عند تنظيف النسيج حول منطقة الجروح باستخدام مطهر فعال كاليود، وكذلك يتم تنظيف النسيج حول منطقة العمل الجراحي أثناء إجراء العمليات الجراحية، ولمنع حدوث حالات الموت الغازي للأنسجة يتم إعطاء المصل المتعدد التأثير إضافة إلى مضاد حيوي مناسب وذلك في حاله الجروح الملوثة بالتراب والاجهاضات المترافقة بارتفاع درجة الحرارة وقبل كل مداخلة جراحية على الأمعاء. وغالباً ما يعطي المصل المضاد لهذا المرض مع المصل المضاد للكزاز.

ثانياً للوقاية من حالات التسمم الغذائي بهذه البكتيريا:-

يجب علينا أن نعرف أنه لا يمكن التخلص من تواجد البكتيريا كما أنه وللعلم لا يوجد علاج طبي فعال لهذا النوع من السم الغذائي، لذلك فإن أهم إجراءات لوقاية من حالات التسمم الغذائي بهذه البكتيريا تتمثل في منعها من النمو والتكاثر وإفراز السم، وذلك بإتباع الخطوات التالية:-

أ- حفظ الأغذية الجاهزة للاستهلاك وخاصة اللحوم ومنتجاتها تحت درجة حرارة 4°م لمنع أبواغ البكتيريا من النمو والتكاثر.

ب- عدم ترك الأغذية خاصة اللحوم ومنتجاتها بعد تحضيرها للاستهلاك فترة عدة ساعات تحت الظروف الملائمة لنمو وتكاثر البكتيريا كأن تترك في فرن دافئ.

ج- يجب تسخين الأغذية قبل استهلاكها يجب تصل درجة حرارة أبرد نقطة في الغذاء إلى درجة 65,5°م.

د- عدم تأخير الفترة الزمنية بين طبخ الأغذية وحفظها بالتبريد.

5- بكتيريا *Salmonella spp.*:

بكتيريا عصوية سالبة لتصبيغ جرام لاهوائية اختياراً، وجميع ضَرْوبها المصلية متحركة بأسواط مُحيطِيَّةُ Peritrichous (باستثناء *S. Gallinarum*)، درجة حرارة نموها المثلى 37ºم. وينتمي لجنس *Salmonella* نوعين هما *S. enterica* و *S. bongori*. ويقسم النوع الأول إلى ست سلالات (تحت نوع subspecies) هي كالتالي:

1- *S.enterica* subsp. *enterica* وهو ممرض للكائنات ذوات الدم الحار.

2- *S.enterica* subsp. *salamae*
3- *S.enterica* subsp. *arizonae*
4- *S.enterica* subsp. *diarizonae*
5- *S.enterica* subsp. *houtenae*
6- *S.enterica* subsp. *indica*

(2–6) جميعها ممرضة لذوات الدم البارد

ويقسم تحت النوع *S.enterica* subsp. *enterica* إلى عدد كبير من الضَرْوب المَصْلِيّة serovar أو طرز سريولوجية Serotype تتجاوز 2400 ضَرْب أو طراز صنفت حسب طريقه Kauffman-White التي استعمل فيها أحرف أبجدية هي (O) لتدل على مولد الضد البدني و (Vi) لتدل على قابليتها لإحداث المرض Virulence و (H) لتدل على مولد الضد السوطي. ومن أهم هذه الضَرْوب المَصْلِيّة ما يلي:

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Choleraesuis	ويسمى *S. choleraesuis*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis	ويسمى *S. enteritidis*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum	ويسمى *S. gallinarum*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Paratyphi A	ويسمى *S. paratyphi* A
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Paratyphi B	ويسمى *S. paratyphi* B
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Paratyphi C	ويسمى *S. paratyphi* C
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Typhi	ويسمى *S. typhi*
Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*	يسمى *S. typhimurium*

كما قسمت بكتيريا السالمونيلا استناداً إلى تكيفها لمضيف واحد أو أكثر إلى المجاميع التالية:

1 - <u>المجموعة الأولى</u>: السالمونيلا المُتكيفة للبشر وهي تشمل *Salmonella typhi* و *S. paratyphi* بأقسامها A و B و C، وتعتبر مرضية للإنسان بسبب إنتاج السم الداخلي Endotoxin والمرض يأخذ شكل الحمى المعوية Enteric fever وتسبب تسمم الدم وحدوث حمى تيفودية مع بكتيريا *S. typhi* وشبه تيفودية مع *S. paratyphi* (A,B,C).

2 - <u>المجموعة الثانية</u>: السالمونيلا المُتكيفة لعدد من الحيوانات (مضيف متخصص)، وتتسبب بشكل أساسي في إحداث عدوى السالمونيلا Salmonellosis فيها، ومن أهم أمثلتها:

Salmonella dublin **في الماشية، و** ***Salmonella choleraesuis*** **في الخنـــــازير، و** ***Salmonella abortus*** **ovis في الخراف، و** ***Salmonella abortus*** **equi في الخيول، و** ***Salmonella gallinarum*** **أو** ***Salmonella pullorum*** **في الدجاج وغيرها من الطيور،**

3 - <u>المجموعة الثالثة</u>: السالمونيلا غير المُتكيفة لمضيف معين، وتتسبب بشكل ثانويّ في إحداث عدوى السالمونيلا Salmonellosis (غير المتخصص لمضيف) ومن أهم أمثلتها:

Salmonella typhimurium **و** ***Salmonella enteritidis*** **وتتسبب في حدوث نزلات معوية في الحيوانات، وهي من الأمراض الحيوانية التي يمكن أن تنتقل للإنسان Zoonosis، مسببة تسمم غذائي للإنسان على هيئة نزلة معوية Enteritis.**

عدوى السالمونيلا Salmonellosis أو التسمم الغذائي السالمونيلي هو المرض الذي تسببه السالمونيلا عند انتقالها بعد تناول عدد معين من خلايا بكتيريا السالمونيلا الحية عن طريق الغذاء أو الماء الملوث بالنسبة للإنسان وعن طريق العلف بالنسبة للحيوانات، وتعتبر كل أنواع السالمونيلا ممرضة وتعتمد درجة الضراوة على السلالة، فقد تصل الجرعة المعدية لبعض ضروب السالمونيلا إلى 15 – 20 خلية، كما قد تكون في بعض الضروب في حدود 10^7 – 10^8 أو أكثر، في حين أن خلية واحدة من بكتيريا ***S. typhi*** **تتسبب في حدوث الإصابة بحمى التيفوئيد.**

وتصيب السالمونيلا الأطفال والبالغين من جميع الأعمار، فالبكتيريا تدخل إلى القناة الهضمية وتصل إلى الأمعاء ثم تعبر من خلال الغشاء المخاطي في الأمعاء الى الخلايا الطلائية التي تخترقها وتتضاعف داخل الخلية ونتيجة لهذا الاختراق يحدث التهاب ينتج عنه إسهال (وهي الأعراض المميزة للنزلة معوية Enteritis).

وقد يحدث من حين لأخر أن تعبر البكتيريا غشاء الخلايا الطلائية وتدخل الى سائل اللمف ومنه الى تيار الدم Bacteremia، ثم تنفذ بين الأغشية الليمفاوية حيث تصيب الطحال والكبد والنخاع، وفى هذه المرحلة تتكاثر البكتيريا في خلايا هذه الأعضاء ثم تعود مرة أخرى إلى تيار الدم، وهنا تبدأ ظهور الحمى وارتفاع درجة حرارة الجسم نتيجة تتواجد البكتيريا في الدم (وهي الأعراض المميزة للحمى المعوية Enteric fever). ونتيجة لوجود البكتيريا في الكبد تنفذ إلى الحوصلة المرارية التي تعتبر وسطاً جيداً لنموها ومنها تنفذ إلى الدم، وقد تصاب الأمعاء ثانية بواسطة الحوصلة المرارية. ومن الممكن أن يتحول المصاب بالمرض إلي حامل مزمن للمرض (خاصة البالغين) نتيجة استيطان هذه البكتيريا للحوصلة المرارية.

أعراض عدوى السالمونيلا Salmonellosis أو التسمم الغذائي السالمونيلي:

لهذا النوع من التسمم الغذائي أعراض حادة تتمثل في حدوث آلام معدية معوية وتقيئ واسهال، وقد تتطور الأعراض إلى دوار وارتفاع درجات حرارة الجسم ثم يليها صداع وقشعريرة، ويعاني المريض من اجهاد شديد وعطش بسبب فقدان رطوبة الجسم عن طريق الإسهال والقيء، ويكون لون البراز أخضر ورائحته كريهة تشبه رائحة الطيور المتعفنة. وقد تليها أعراض مزمنة تتمثل بالتهابات محدودة في المفاصل والعظام والأغشية الدماغية في 5 % من الحالات تظهر بعد الأعراض الحادة بفترة تتراوح بين 3 - 4 أسابيع.

وتظهر الأعراض الحادة للتسمم بعد 6 - 24 ساعة من دخول البكتيريا بأعداد مناسبة إلى الجهاز الهضمي، وفي حالات قليلة قد تظهر الأعراض بعد 3 ساعات، كما قد تطول فترة ظهور الأعراض إلى 72 ساعة وذلك حسب نوع وأعداد البكتيريا التي تسبب التسمم وعمر وحالة الشخص الصحية، أما في حالة الإصابة بحمى التيفوئيد تتراوح فترة الحضانة لـــهذا المرض بين 7 - 21 يوم وتمدد فترة المرض من 5 أيام إلى إلى عدة أسابيع ويعتمد ذلك على مدى فعالية الإجراءات العلاجية المتخذة.

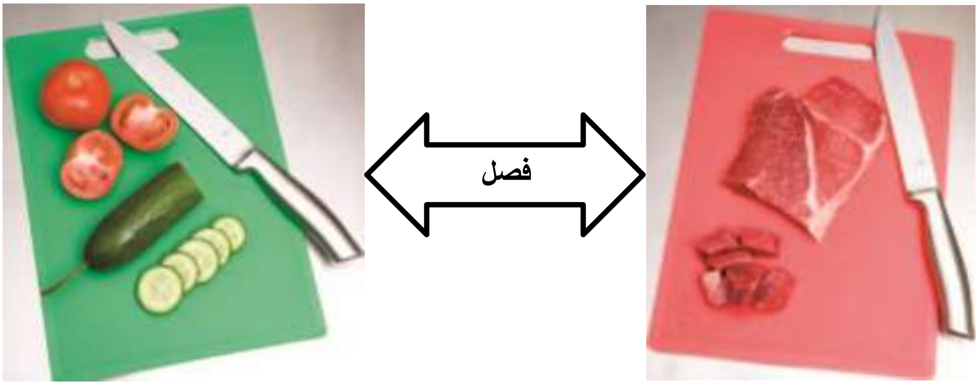
إن بكتيريا السالمونيلا واسعة الانتشار في الحيوانات، خاصة الخنازير والدواجن، وكذلك من العديد من المصادر البيئية كالماء والتربة والحشرات وأسطح العمل ومخلفات الحيوانات، ومنها يمكن أن تنتقل إلى الأغذية ومنها إلى الإنسان وتتسبب في إحداث عدوى السالمونيلا Salmonellosis أو التسمم الغذائي السالمونيلي. ويعد الأشخاص الحاملين المزمنين للبكتيريا Chronic carriers من المصادر التي تسهم اسهام كبير في التلوث الأغذية بهذه البكتيريا. لذا يحظر على الأشخاص المرضى بحمى التيفوئيد أو الأشخاص الحاملين للمرض العمل في مجالات إعداد وتجهيز وتداول وتصنيع الأغذية، حيث يتابع الأشخاص الحاملين المزمنين للبكتيريا بالفحص الدوري ويمنعوا من العمل في تحضير وتداول الأغذية حتى يتم الحصول على ثلاث مزارع سلبية متتابعة لفحص زراعة البراز على مدى ثلاثة أشهر متتالية، كما ينبغي أن يفحص العاملون في المجالات السابقة دوريا ضد الأمراض المعدية الأخرى المنقولة عن طريق الغذاء، ويجب أن تكون بحوزتهم شهادات صحية تفيد خلوهم من تلك الأمراض.

كما يجب أن تنمى لدى هؤلاء الأشخاص الممارسات الصحية الجيدة والشئون الصحية والسلامة الغذائية ابتداء من ابجديات واسس النظافة الشخصية وصولاً إلى مواصفات وشروط استلام وطرق وأسس حفظ وتخزين الأغذية المختلفة ضمن درجات الحرارة الآمنة، وتحضير وتداول وطهي المواد الغذائية بالشكل الصحيح والآمن، ونظافة الأدوات والمعدات المستعملة في

تحضير، طهي، وتقديم الأغذية الى المستهلك، وذلك من خلال المحاضرات الإرشادية والدورات التدريبية والتوعية الدائمة بمخاطر التسمم الغذائي والأمراض المنقولة عن طريق الغذاء.

وتُرتَبطُ السالمونيلا بكل أنواع الغذاء الملوث ومن أهمها الدواجن واللحوم النية، ومنتجات الألبان المختلفة، ويعد البيض الخام أو المجفف مصدراً من مصادر المهمة لتلوث الأغذية التي يدخل في تكوينها (كالكيك والحلويات والمايونيز...الخ) ببكتيريا السالمونيلا. لذلك فمن المهم طهي اللّحوم جيداً قبل تناولها، وعدم تناول منتجات الألبان غير المعاملة حرارياً، وكذلك تجنب البيض النيء أو الأطباق الدخل في تكوينها (بدون معاملة حرارية)، ويجب طهى الأغذية المشتبه بنقلها لبكتيريا السالمونيلا طهياً جيداً. وعدم ترك الأغذية تحت درجات الحرارة الملائمة لنمو البكتيريا، و في حال عدم استهلاكها فإنها تُخزن الأغذية في درجات حرارة منخفضة (لا تزيد عن 6°م)، مع عدم تأخير الفترة الزمنية بين طهي الأغذية وحفظها بالتبريد.

كما ينبغي الحرص على بقاء الأغذية الخام والأغذية المطهية منفصلة، وضمان نظافة الأسطح والمعدات والأواني المستخدمة في إعداد وتجهيز وتداول الأغذية. ومن القواعد المهمة التي ينبغي الحرص على اتباعها دوماً عدم استخدام الأسطح والسكاكين و أي من التجهيزات التي سبق استخدامها في تقطيع وإعداد الدواجن واللحوم لإعداد السلطات أو الخضار أو أي من الأغذية التي تجهز بدون معاملات حرارية.



الشكل رقم (72): لتجنب عدوى السالمونيلا وغيرها يجب عدم استخدام أي أدوات أو تجهيزات سبق استخدامها في وإعداد الدواجن واللحوم النية لإعداد السلطات والأغذية التي لا تعامل بالحرارة، عن (CSIRO, 2010).

6- بكتيريا *Shigella spp.*:

هي أيضاً بكتيريا عصوية سالبة لتصبيغ جرام لاهوائية اختيارا، إلا أنها (بعكس جنس *Salmonella*) غير متحركة، كما أن الانسان يعتبر المصدر الرئيس لهذا الجنس الذي نادراً ما يوجد في الحيوان. وينتمي إلى هذا الجنس أربعة أنواع هي *Shigella dysenteriae* و *Shigella flexneri* و *Shigella sonnei* و *Shigella boydii*. والشيجيلا من البكتيريا شديدة العدوى التي تنتقل عن الطريق البرازي - الفموي Fecal Oral Route، حيث أن الجرعة المعدية لبكتيريا *Shigella* منخفضة جداً إذا تبلغ 10 – 100 خلية فقط (حسب السن والحالة الصحية للمريض). ويطلق على حالة العدوى الغذائية التي يتسبب بها أنواع هذا الجنس عدوى الشيجيلا Shigellosis، ورغم أن جميع أنواع هذا الجنس مسئولة عن عدوى الشيجيلا المنقولة عن طريق الغذاء إلا أن *Shigella sonnei* هي من أهم المسببات لهذه الحالة الناتجة عن الغذاء الملوث، أما الأنواع الأخرى فتكون أكثر ارتباطا بالماء الملوث، في حين أن *Shigella flexneri* تنتقل أيضاً عن طريق الاتصال الجنسي عند الشواذ.

ويُعد العاملون في مجال إعداد وتحضير وتداول الأغذية يمكن أن يشكلوا أهم مصادر انتقال العدوى عند عدم مراعاة الشئون الصحية فالبكتيريا تنتقل عند عدم غسل اليدين بشكل جيد وخصوصاً تحت الأظافر الملوثة كما يمكن أن تنتقل هذه البكتيريا عن طريق الذباب.

تحدث عدوى الشيجيلا Shigellosis، الذي تبدأ أعراضها بعد فترة 12 – 48 ساعة من تناول غذاء ملوث أو ماء ملوث بالبكتيريا، نتيجة تلتصق بكتيريا *Shigella* بالخلايا المبطنة لجدار الأمعاء، ثم تخترق هذه الخلايا بعدها تبدأ في التكاثر داخل هذه الخلايا، ثم تمتد إلى الخلايا المبطنة المجاورة، مما يؤدى إلى تهتك الأنسجة. وبعض سلالات بكتيريا *Shigella* تنتج سم Shiga toxin. ومن أعراض عدوى الشيجيلا Shigellosis الآم في البطن (مغص)، قيء وإسهال ببراز دموي مخاطي وزحار مع وجود حمى. كما ترتبط العدوى بتقرح الأغشية المخاطية، والنزيف من المستقيم، والجفاف الشديد وقد ترتفع نسبة الوفيات إلى 10 – 15 % مع بعض السلالات. وقد تحدث عقب عدوى الشيجيلا Shigellosis مضاعفات مثل متلازمة رايتر التي يعاني منها حوالى 3 % من الأشخاص المصابين وتتلخص أعراضها بآلام في المفاصل، وتهيج العينين، والتبول المؤلم وهذه الأعراض يمكن أن تستمر لشهور أو سنوات. كما يمكن أن تودي إلى التهاب المفاصل المزمن الذي يصعب علاجه. وكذلك قد تتطور الإصابة إلى حالة مُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) التي تتميز بالفشل الكُلوي وفقر الدم التكسري، مما يؤدى إلى فقدان نهائي لوظائف الكلى (الفشل الكلوي التام) ثم الموت.

7- بكتيريا *Escherichia coli* المهاجمة للأمعاء:

عرفنا سابقاً أن بكتيريا *E. coli* هي بكتيريا عصوية سالبة لتصبيغ جرام لاهوائية اختياراً، تعيش بشكل طبيعي في الجزء السفلي من الأمعاء الدقيقة للإنسان والحيوانات ذات الدم الحار كجزء من المجموعة البكتيرية الطبيعية Microflora، ولذلك فلم يكن يعرف انها أنها تتسبب في مشاكل في القناة الهضمية، لكن كان من المعروف أن بكتيريا *E. coli* يمكن أن تتسبب في حدوث الإصابة في القناة البولية عند الإنسان، حيث يمكن أن تنتقل من الأمعاء إلى الجهاز البولي إما عن طريق الدم أو عن طريق الأوعية اللمفاوية، وفي كثيراً من الحالات يمكن أن تحدث عن طريق دخول الخلايا عبر الإحليل ثم إلى المثانة البولية وتنتقل إلى الحالبين ثم إلى الكليتين وهذا يرجع إلى ضعف النظافة الشخصية. وقد تم التعرف إلى عدة سلالات من بكتيريا *E. coli* يمكن أن تتسبب في مهاجمة الأمعاء مسببة التهاب معدي معوي للإنسان، ومنها:

أ - الإشريشيا كولاى المسممة للأمعاء Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). وهي سلالة من بكتيريا *E. coli* تكون قادرة على اختراق الخلايا الطلائية في الامعاء الدقيقة مسببة اسهال كما تنتج سموم مقاومة او غير مقاومة للحرارة او الاثنين معاً. وهذه السلالة تمثل نسبة ضئيلة نسبيا من بكتيريا *E. coli*، وتتسبب بحدوث الإسهال للإنسان في مختلف الفئات العمرية، وخصوصاً حدوثه بين الأطفال الرضع Infantile diarrhea في الدول الأقل نمواً وكذلك الحالات المعروفة بإسهال المسافرين Traveller's diarrhea. أشيع أعراض العدوى تشمل الإسهال المائي، المغص الحاد، الحمى منخفضة درجة الحرارة، والغثيان والتوعك. وتشير الأبحاث إلى أن عدد البكتيريا الضرورية لإحداث العدوى تتراوح بين 10^6 - 10^{10} خلية/جرام في الامعاء الدقيقة (في حين يحتاج الرُضع إلى عدد أقل حتى تحدث العدوى)، حيث تتكاثر في الأمعاء الدقيقة وتنتج السموم التي تؤدى إلى إفراز السوائل.

وإذا كانت الجرعة المعدية كبيرة، فقد يبدأ الإسهال بعد 24 ساعة. وأثناء المرحلة الحادة من المرض يتم إفراز أعداد كبيرة من البكتيريا المسممة للأمعاء في البراز. ويتم التفريق بين السلالات المسممة للأمعاء عن بكتيريا *E. coli* الموجودة كساكن طبيعي في الأمعاء بمجموعة من الاختبارات المناعية واختبارات مزارع الأنسجة أو الاختبارات الوراثية المصممة لكشف السموم المعوية أو الجين الذى ينتجها.

وتنتج هذه السلالات نوعين من السموم المعوية Enterotoxins الأول غير مقاوم للحرارة Heat Labile (LT) يتلف بالتسخين عند 60°م لمدة 30 دقيقة وهو غير مقاوم للأحماض، وهذا السم هو بروتين وزنه الجزيئي يتراوح بين 84 – 91 × 10^3 دالتون، شبيه بسم الكوليرا

Choleragen من حيث التركيب والصفات المصلية وكذلك أسلوب التأثير ولكن يختلف عنه في محتوى الاحماض الامينية فيه. أما الثاني فهو مقاوم للحرارة Heat Stable (ST) لا يتلف إلا عند تسخينه إلى 100°م لمدة 15 دقيقة كما يقاوم تأثير الأحماض، وهو عبارة عن ببتيدات عديدة Polypeptide حامضية (لا تحتوي على احماض امينية قاعدية) ويوجد منه نوعان ST_a و ST_b أوزانهما الجزيئية 5000 و 2000 دالتون على التوالي. ومعظم السلالات تنتج كل من النوعين من السموم الا ان بعض السلالات تنتج نوع واحد فقط. ويُشار إلى أن هذه السموم مسئولة عن مرض اسهال الرضع وكذلك مرض اسهال المسافرين، حيث أن السم LT يساعد البكتيريا على الارتباط بالخلايا الطلائية المبطنة للأمعاء، وينشط إنزيم Adenylate-cyclase مما يؤدي الى زيادة مستوى AMP الحلقي (cAMP) الذي يسبب خللاً او اضطراباً في وظائف الخلايا الطلائية مما يؤدي الى زيادة افراز السوائل (الماء والاملاح) في تجويف الامعاء وحدوث اسهال مائي غزير، كما ان السم ST يؤثر بطريقة مماثلة حيث ينشط انزيم Guanylate-cyclase ويزيد من مستوى GMP الحلقي (cGMP) مما يؤدي الى افراز السوائل في تجويف الامعاء وحدوث اسهال مائي.

ب - الإشريشيا كولاى الممرضة للأمعاء Enteropathogenic *E. coli* (EPEC). وتعرف بأنها بكتيريا *E. coli* تنتمى إلى مجموعات مصلية ثبتت قدرتها على إحداث المرض (التهاب معدي معوي) وبائيا، إلا أن سميتها لا تتعلق بإفراز السم المعوي. وتتلخص أعراض الالتهاب المعدي المعوي الذي تسببه الإشريشيا الممرضة للأمعاء إلى إسهال مائي أو دامي (مصحوب بدم)، ويرتبط الإسهال المائي بالتصاق البكتيريا بجدار الأمعاء وتأثيرها على سلامة جدار الأمعاء. أما الإسهال الدامي فيرتبط بالتصاق البكتيريا بجدار الأمعاء وتدميرها للأنسجة الطلائية، ويعتقد أن ذلك نتيجة سم داخلي مرتبط بالبكتيريا Endotoxins مشابه لسم بكتيريا *Shigella dysenteriae*.

وتوثر الإشريشيا الممرضة للأمعاء على الرضع أكثر من غيرهم وخاصة أولئك الذين يرضعون من زجاجة الإرضاع، وقد يؤدي الإسهال الذي تحدثه الإشريشيا الممرضة للأمعاء إلى حدوث حالة الجفاف لدى الأطفال الرضع إذا ما امتدت فترته، وإذا لم يتم تعويض الماء والأملاح المفقودة عن طريق الإسهال فقد تودي حالة اختلال توازن الأملاح إلى الوفاة (وقد يصل معدل الوفيات إلى 50 % في بلدان العالم الثالث).

ج - الإشريشيا كولاى المخترقة للأمعاء Enteroinvasive *E. coli* (EIEC). وتتسبب في حدوث حالات شبيه بحالات الزحار البكتيري أو العصوي Bacillary Dysentery الذي

تسببه بكتيريا الشيجيلا (*Shigella*-like Diarrhea)، وتتميز اعراضه بحدوث حمى، وتشنجات بطنية (مغص حاد)، اسهال مائي متبوعاً ببراز دامي بشكل ضئيل واختراق وتدمير للخلايا الطلائية في الأمعاء الغليظة.

د - <u>الإشريشيا كولاى المنزفة للأمعاء **Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)**</u>. وتُعرف أيضاً باسم ***E. coli* O157:H7**. وهذه السلالة تعد صنفا نادراً من الإشريشيا تفرز كميات كبيرة من واحد أو أكثر من السموم الخلوية **Vero Cytotoxins (VTs)** الشبيهة بسم بكتيريا ***Shigella dysenteriae* (Shiga toxin)**، وهذه السموم تصيب القولون (الامعاء الغليظة) اكثر من اصابة الامعاء الدقيقة مما يحدث أضرارا جسيمة في الغشاء المبطن للأمعاء الغليظة مسببة مرض التهاب القولون النزفي **Hemorrhagic Colitis** والذي يتميز بمغص شديد وإسهال يبدأ مائيا، ثم ينقلب إلى إسهال دامي. وقد يحدث قيء أحيانا، أما الحمى فنادرة وتكون منخفضة درجة الحرارة، وتدوم الأعراض 8 أيام في المتوسط، ويظهر على بعض الأفراد الإسهال المائي فقط. وعادة ما يشفى المريض بدون تناول أي أدوية. لكن قد يظهر على بعض المصابين (وخاصة الأطفال صغار السن) مُتَلاَزِمَةُ انْحِلاَلِ الدَّمِ-اليوريمية **Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)** التي تتميز بالفشل الكُلوي وفقر الدم التكسري، التي سبق الإشارة إليها في حالة عدوى الشيجيلا **Shigellosis**.

وقد سُجلت أول حالة لمرض التهاب القولون النزفي في عام 1982م حيث حدثت حالات تسمم في بعض مناطق الولايات المتحدة الامريكية نتيجة تناول شطائر لحم مفروم من مطاعم الوجبات السريعة، وقد كان جميع المصابين كانوا يعانون من اسهال دموي وتقلصات شديدة في البطن وقد وجد ان 62 % من المصابين كانوا يعانون من غثيان و 49 % كانوا يعانون من القيء و 7 % فقط كانوا يعانون من حمى. وقد عُزلت سلالة ***E. coli* O157:H7** من براز المرضى. كما وجد أن سلالات أخرى من بكتيريا ***E. coli*** مثل **O26** و **O113** و **O121** و **O145**، يمكن أن تتسبب ايضاً بإسهال دموي اقل شدة. والجرعة المعدية لسلالة ***E. coli* O157:H7** غير معروفة بدقة لكن يعتقد أنها مماثلة لجرعة بكتيريا ***Shigella*** والتي تبلغ **10 – 100** خلية.

إن المصدر الرئيس للتلوث بالسلالة ***E. coli* O157:H7** هو روث الحيوانات، حيث تم عزل بكتيريا ***E. coli* O157:H7** في عام 1989م من براز (روث) الابقار في المملكة المتحدة مما يدل على ان الماشية قد تكون مصدر لهذه العدوى. إن الروث يمكن ان يلوث الضرع وآلات

الحلابة ومنها تصل البكتيريا الى الحليب وبالتالي تنتقل البكتيريا من الماشية الى الانسان عن طريق استهلاك حليب هذه الحيوانات. كما وجد ان تلوث الذبيحة اثناء عملية الذبح والاعداد يجعل اللحم البقري مصدراً لهذه العدوى، وقد سُجل أن لحم الأبقار المفروم ناقص الطهى أو النيء هو الغذاء المسئول عن معظم حالات التسمم المسجلة بالبكتيريا.

وعلى الرغم من ارتباط عن بكتيريا *E. coli* O157:H7 (كما سبقت الإشارة) بالأغذية الحيوانية (لحم الأبقار المفروم والحليب الخام)، فإن استخدام روث الأبقار كسماد (غير متخمر) ينقل البكتيريا الى الخضروات والفواكه، كما يمكن ان يتسرب إلى مياه الشرب العامة اذا كانت الابار قريبة من اماكن تربية المواشي او إلى الانهار أو بفعل الفيضانات التي تنقل ذلك الروث، إضافة إلى أن هناك اشخاص يمكن ان يحملوا البكتيريا ولا تظهر عليهم الاعراض ويساهمون في نشر هذه البكتيريا لذا يجب أن يحضر عليهم العمل في مجال إعداد وتحضير وتداول الأغذية.

8- بكتيريا *Listeria monocytogenes*:

بكتيريا عصوية مستقيمة أو محدبة قليلا، موجبة لتصبيغ جرام، تترتب غالبا على شكل أزواج (النهاية مع النهاية وبزاوية حادة) ويمكن أن تشكل في ترتيبها الأحرف الصينية، متحركة غير نشطة على درجة 37°م ولكنها أنشط على درجة 25°م في المزارع السائلة. درجة حرارة نموها المثلى 25°م – 30°م، وهي متحملة للبرودة ودرجة الحرارة القصوى لنموها 45°م.

تتسبب بكتيريا *Listeria monocytogenes* في الإصابة بعدوى أو داءُ اللِّيسْتَرِيَّات Listeriosis وهو اسم لمجموعة من الأعراض التي تنتج عن غزو البكتيريا لمجرى الدم مسببة التهاب السحايا والتهابات عنق الرحم في الحوامل، مما قد يؤدى إلى الإجهاض التلقائي (في الثلث الثاني أو الثالث من الحمل) أو نزول الجنين ميتا، (فهي عادة تصيب عادة السيدات الحوامل، الأطفال حديثي الولادة والأشخاص الذين يعانون من ضعف في جهاز المناعة لديهم). وهذه الأمراض تسبقها عادة أعراض تشمل الحمى المستمرة، آلام عضلية، وأعراض أخرى مثل الصداعِ، تصلّب الرقبة، والتشويش، وبعض الأعرض المعدية المعوية مثل الغثيان والقيء والإسهال وهذه الأعرض قد تسبق الأشكال الأكثر خطورة من داءُ اللِّيسْتَرِيَّات.

وتتمثل إلية الإصابة ببكتيريا *Listeria monocytogenes* بدخولها إلى الجسم بواسطة الغذاء الى الفم ومن ثم الى الأمعاء وبعدها ترتبط البكتيريا بالغشاء المخاطي المعوي ومن ثم يحدث لها ابتلاع بواسطة الخلايا البَلْعَمِيَّة phagocyte، وتستطيع البكتيريا الخروج من الخلايا البَلْعَمِيَّة نتيجة إفرازها بروتين listeriolysin O الذي يعمل على تحطيم أغشية الخلايا البَلْعَمِيَّة. عندها تسطيع البكتيريا الانتقال الى الخلايا المجاورة عن طريق احاطتها بغشاء مزدوج من خلايا العائل.

تُشير بعض الدراسات أن 1 – 10 % من البشر يحملون *Listeria monocytogenes* في أمعائهم، كما عثر عليها في 37 نوع من الثديات البرية والمستأنسة، إضافة إلى 17 نوع من الطيور، وربما يمكن عزلها من بعض أنواع السمك والمحار، ويمكن عزلها من التربة والعلف المخمر (Silage).

ويعتبر السيلاج (العلف المتخمر) الملوث من المصادر الرئيسية لانتقال داءُ اللِّيسْتَرِيَّات الى أبقار الحليب، حيث وجدت علاقة قوية بين تغذية الماشية بسيلاج ملوث وظهور داءُ اللِّيسْتَرِيَّات (الذي يعرف بمرض السيلاج) في ماشية الحليب التي تصاب بمرض التهاب الضرع، وتفرز تلك الحيوانات المصابة البكتيريا في الحليب والروث. وبالتالي ترتبط البكتيريا بالعديد من الأغذية مثل الحليب غير المبستر ومنتجات الألبان المختلفة واللحوم المفرومة واللحوم المتخمرة والاسماك والاغذية البحرية النية او المدخنة والخضراوات النية، والتربة ومصادر بيئية أخرى.

9- بكتيريا *Campylobacter jejuni*:

بكتيريا عصوية رفيعة ومنحنية، سالبة لتصبيغ جرام، متحركة، محبة لتراكيز منخفضة من الهواء (3 – 5 % من الأكسجين و 2 – 10 % ثاني أكسيد الكربون، لتحقيق أفضل نمو)، لكنها حساسة للضغوط البيئية (مثل زيادة تركيز الأكسجين إلى 21 % والجفاف والمطهرات والظروف الحامضية). درجة حرارة نموها المثلى تتراوح بين 42°م – 43°م، ودرجة الحرارة القصوى لنموها 45°م ويمكنها أن تنمو عند 37°م لكنها لا تنمو تحت أقل من 30°م.

بعض سلالات *C. jejuni* تنتج سم معوي غير مقاوم للحرارة CGT يشترك مع سم الكوليرا CT، وسم (LT) *E. coli* في بعض الصفات. حيث يؤدي CGT الى زيادة مستوى AMP الحلقي (cAMP) في الامعاء مما يؤدي الى زيادة تجمع السوائل في الامعاء وحدوث الاسهال كما ان *C. jejuni* لها القدرة على غزو الانسجة السليمة. وتتسبب هذه البكتيريا بحدوث عدوى الكامبيلوبكتر Campylobacteriosis أو ما تعرف باسم الحمى المعوية الكامبيلوباكتيرية ومن أعراضها حدوث الإسهال الذى قد يكون مائياً أو لزجاً، وقد يحتوى على الدم (الخفي عادة Occult Blood) كما يحتوى على الخلايا البيضاء البرازية. من الأعراض الأخرى شائعة الحدوث الحمى وألم البطن والغثيان والصداع وألم العضلات. وعادة ما يحدث المرض بعد 2 – 5 أيام من تناول الطعام أو الماء الملوث، ويدوم بصفة عامة من 7 – 10 أيام، لكن ليس من النادر أن تحدث انتكاسات (في حوالى 25 % من الحالات). ومعظم الحالات تشفى من تلقاء نفسها ولا تعالج بالمضادات الحيوية، إلا أن استخدام المضادات الحيوية يقلل من طول الفترة التي يقوم خلالها المريض بإفراز البكتيريا مع البراز.

وقد تم الاعتراف الآن بهذه البكتيريا كإحدى مسببات الأمراض المعوية المهمة حيث تطورت طرق عزلها من البراز، فقد كان الظن الشائع أنها أساسا تسبب المرض في الحيوانات فتؤدى إلى الحمى المعوية والإجهاض في الأغنام والماشية، لكن الدراسات بينت أن هذه البكتيريا هي من أكثر مسببات الإسهال البكتيري شيوعاً في الولايات المتحدة، فهي تسبب النزلات المعوية أكثر من السالمونيلا والشيجيلا معا (من 2 – 4 مليون حالة سنويا). وتشير الدراسات أن الجرعة المعدية من بكتيريا *C. jejuni* ضئيلة وتتراوح بين 300 – 400 حيث تكفى لإحداث المرض عند بعض الأفراد بينما يحتاج غيرهم إلى جرعات أكبر (بناءً على مناعة الشخص).

وتوجد بكتيريا *C. jejuni* في امعاء حيوانات المزرعة والدواجن والحيوانات الاليفة، كما يوجد في مياه المجاري ومياه الانهار ويوجد هذا الميكروب في براز الأغنام والخنازير وكذلك

ذبائح الخنازير والأغنام والدجاج الرومي. وتُعد الدواجن من أكثر الاغذية تلوثاً بهذه البكتيريا حيث تشير الدراسات أن نسبة التلوث في الدجاج تتراوح بين 20 – 100 % وفي دراسة وصلت نسبة التلوث في الدجاج الى 94 % في استراليا. كما أن الحليب الخام يمكن أن يشكل مصدراً للعدوى نتيجة وجودها في امعاء حيوانات المزرعة، كما أن الماء غير المكلور قد يكون بدوره مصدرا للعدوى. وللوقاية من حالات العدوى يوصى بطهي الدواجن بشكل جيد، والامتناع عن تناول الحليب غير المبستر أو الماء غير المكلور. كما ينبغي أيضاً الحرص على عدم استخدام الأسطح والسكاكين و أي من التجهيزات التي سبق استخدامها في تقطيع وإعداد الدواجن واللحوم لإعداد السلطات أو الخضار أو أي من الأغذية التي تجهز بدون معاملات حرارية.

10- بكتيريا *Yersinia enterocolitica* و *Y. pseudotuberculosis*:

بكتيريا *Yersinia* بكتيريا عصوية الشكل صغيرة سالبة لتصبيغ جرام وهي ليست الفلورا الدقيقة **Microflora** (المجموعة البكتيرية الطبيعية) للإنسان لكن *Y. enterocolitica* كثيرا ما تعزل من عينات إكلينيكية مثل الجراح والبراز والبصاق والغدد الليمفاوية المحيطة بالأمعاء، أما *Y. pseudotuberculosis* فقد عزلت من الزائدة الدودية المريضة في البشر. وكثيرا ما عزل الكائنان من حيوانات كالخنازير، والطيور والقنادس والقطط والكلاب. ويضم هذا الجنس ثلاثة أنواع مرضية هي *Y. pestis* و *Y. pseudotuberculosis* و *Y. enterocolitica* التي لم يكتشف غيرها في المصادر البيئية مثل البرك والبحيرات والمصادر الغذائية مثل اللحوم والآيسكريم والحليب كما يمكن العثور على سلالات من *Y. enterocolitica* في اللحوم (الخنازير والأبقار والضأن...إلخ)، والمحار والسمك والحليب الخام. ووجد أن معظم السلالات المعزولة لا تسبب أي حالات مرضية.

وتتسبب *Y. pestis* في حدوث مرض الطاعون، أمـــا *Y. pseudotuberculosis* و *Y. enterocolitica* فتتسببان في حدوث التهاب معدي معوي يطلق عليه اسم عدوى اليَرْسَنِيَّا أو داءُ اليَرْسَنِيَّات **Yersiniosis**. ويتميز هذا المرض عادة بأعراض مثل الالتهاب المعدي المعوي مع الإسهال و/أو القيء، إلا أن الأعراض الدالة هي الحمى وألم البطن. وعدوى اليَرْسَنِيَّا تحاكى التهاب الزائدة الدودية والتهاب الغدد الليمفاوية المعوية، غير أن البكتيريا قد تصيب مناطقا أخرى كالجروح والمفاصل والقناة البولية. ويبدأ المرض عادة بعد 24 - 48 ساعة من ابتلاع البكتيريا عن طريق الطعام أو الشراب، (لكن الجرعة المعدية لا تزال مجهولة). وقد يحدث أن تشخص عدوى اليَرْسَنِيَّا خطأ على أنها مرض كرون **Crohn's disease** (التهاب الأمعاء الموضعي) أو التهاب الزائدة الدودية.

11- بكتيريا *Vibrio spp.*:

بكتيريا *Vibrio* عصوية الشكل مستقيمة أو منحنية متحركة باسواط قطبية، هوائية ولا هوائية اختيارية، عضوية التغذية، موجبة الإنزيم الأوكسيديز محبة للحرارة المتوسطة كما أنها يمكن أن تكون متحملة لدرجة الحرارة المنخفضة Psychrotrophic سالبة لصبغة جرام. ومن الأنواع المهمة لهذا الجنس *Vibrio cholerae*. وتسبب هذه البكتيريا الإصابة بمرض الكوليرا، وهناك أنواع أخرى من هذا الجنس تسبب حالة تدعى عدوى الفبريو Vibriosis وهو اصطلاح طبي يعني الأعراض المرضية المصاحبة للإصابة بإحدى أفراد مجموعة *Vibrio spp.* عدى *V. cholerae*، ويسمي أيضاً هذا النوع من الإصابة (Non Vibrio cholera infection) وأكثرها انتشارا وإمراضا للإنسان *V. parahaemolyticus* و *V. vulnificus* وأنواع أخرى.

أ - **بكتيريا *Vibrio Cholerae*:**

هي بكتيريا عصوية الشكل ملتوية قليلاً (واوية الشكل)، سالبة التصبيغ بصبغة جرام، متحركة ولها سوط واحد في نهاية الخلية، لاهوائية اختيارية، تنمو على الآجار المغذي وتكون مستعمراتها لامعة وشكلها غير منتظم، وتنمو البكتيريا عند pH يتراوح بين 6,0 – 9,6 والأس الهيدروجيني pH المثالي لنموها هو 7,6 – 8,6. وتنمو عند نسبة من ملح الطعام NaCl تتراوح بين صفر – 6 %. وتتراوح درجات حرارة نموها بين 15 - 45°م وتكون درجة الحرارة المثلى لنموها بين 30 - 35°م.

وتنقسم بكتيريا *V. cholerae* إلى نمطين حيويين الأول يُعرف بالنمط الحيوي التقليدي *V. cholerae* biotype *cholerae* والثاني نمط الطُور *V. cholerae* biotype *eltor*، وقد عُزل لأول مرة عام 1905م في مخيم للحجاج إلى مكة المكرمة في شبه جزيرة سيناء وسميت نسبة الى اسم منطقة الطُور التي عزلت فيها في سيناء ومنذ ذلك الحين ازدادت أهميتها لكونها اصبحت المسؤولة عن احداث الأوبئة الأخيرة في جنوب شرق اسيا وفي افريقيا وهي اكثر انتشارا من النمط التقليدي الذي بدأ بالانحسار، وبالرغم من وجود بعض الاختلافات بين النمطين الحيويين حيث أن النمط الثاني أكثر مقاومة للظروف الخارجية ونسبة الوفاة فيها أقل، إلا أنهما متشابهان من حيث الأعراض المرضية العامة. وتسبب هذه البكتيريا الإصابة بمرض الكوليرا وهو عبارة عن التهاب بكتيري حاد يصيب الجهاز الهضمي وخصوصاً الأمعاء الدقيقة ويتميز بإسهال حاد ومتكرر وقيء مع آلام وجفاف في الجسم وهذه البكتيريا حساسة للعصارة المعدية، لهذا من لديهم قلة في العصارة يكونون معرضين أكثر من غيرهم، ومن الملاحظ أن الأشخاص الذين يعيشون في المناطق الموبوءة بهذا المرض يكون لديهم تعود تدريجي ويكتسبون مناعة طبيعية.

إن طريقة العدوى للكوليرا هو عن طريق الفم ، وذلك بشرب السوائل أو أكل المأكولات الملوثة بهذه البكتيريا. مستوطن مرض الكوليرا مستوطن في مناطق عدة في آسيا ومنطقة الشرق الأوسط وإفريقيا وأمريكا الجنوبية، أيضاً هناك حالات من انتشار المرض المحدود في أوروبا وأمريكا واستراليا. عادة يحدث الوباء في الأشهر الدافئة ويكون أعلى لدى الأطفال في المناطق المستوطن المرض فيها ، أما في المناطق غير الموبوءة فإن جميع الأعمار معرّضون لمرض الكوليرا ويحدث في جميع فصول السنة.

وتفرز بكتيريا ***Vibrio Cholerae*** سم خارج الخلية **Exotoxin** وهو المسئول عن أعراض المرض، وسم هذه البكتيريا من النوع المعوي **Enterotoxin** وهو يتركب من بروتين بسيط ذو وزن جزيئي يبلغ حوالي **84000** دالتون، ولا يحتوي على أي مركب كربوهيدراتي في حين يحتوي على **1 %** دهون. ويتألف السم من وحدتين الأولى **A** ويبلغ وزنها الجزيئي **28000** والثانية **B** ويبلغ وزنها الجزيئي **56000**. والسم حساس للحرارة حيث يتحلل باستخدام درجة حرارة **56**°م. ويُنشّطُ سمُّ الكوليرا إنزيمَ **Adenylate Cyclase** في خلايا الغشاء المخاطي المعويِ مؤدياً إلى زيادة مستويات الادينوزين ثلاثي الفوسفات **(cAMP) Cyclic AMP**، وإفراز الماء H_2O و أيونات Na^+ و K^+ و Cl^- و HCO_3^- إلى تجويف الأمعاء الدقيقة مسبباً حالات الإسهال الحاد المصاحبة لهذا التسمم.

تختلف شدة أعراض مرض الكوليرا من شخص لآخر، وتحدث الأعراض بعد فترة حضانة للمرض تتراوح من يوم إلى ثلاثة أيام. فالأعراض قد تكون خفيفة وقد تكون حادة وشديدة، وقد تؤدي إلى الوفاة. تبدأ الأعراض بإسهال حاد على شكل سائل مع قيء ويحدث إثر ذلك فقدان شديد للسوائل والأملاح ، لهذا يكون هناك اختلال شديد في سوائل وأملاح الجسم إذا لم تعوض تحدث مضاعفات أخرى مثل قلة التبول وتأثر في وظائف الكلى وآلام في العضلات إذا استمر عدم علاج هذه الحالة فإنه يحدث هبوط في الدورة الدموية وضغط الدم ثم فقدان الوعي والوفاة. ويتم تشخيص المرض عن طريق زراعة عينة من البراز أو أخذ مسحة من المستقيم، ولا بد من التعرف على بكتيريا الكوليرا لأنها تتشابه مع بكتيريا أخرى مسببة لنفس الأعراض مثل السالمونيلا والشيجيلا وغيرها.

إن علاج مرض الكوليرا يعتمد على تصحيح فقدان السوائل والأملاح وذلك بإعطاء كميات كبيرة محسوبة من السوائل والأملاح، أيضاً يعطى مضاد حيوي لقتل بكتيريا الكوليرا. أما الوقاية من هذا المرض تتم بالتخلص الجيد من فضلات الإنسان وتعقيم الماء جيداً، وتجنب أكل الخضروات غير المطبوخة جيداً أو غير المغسولة.

ب - بكتيريا ***Vibrio parahaemolyticus***:

تتواجد هذه البكتيريا عند مصاب الأنهار وفي البيئات المائية. لهذا فهي تلوث الأسماك والقشريات والأحياء التي تعيش في البيئات البحرية. تسبب هذه البكتيريا عند تناولها ضمن الأغذية البحرية الملوثة بها التهاب الجهاز الهضمي، الذي يتميز بأعراض تشمل: إسهال، مغص، غثيان، قيء، صداع، حمى، قشعريرة وارتجاف. التسمم عادة خفيف أو متوسط ونادراً ما يحتاج للعناية الطبية. وتظهر الأعراض بعد 4 – 96 ساعة من تناول الغذاء البحري الملوث، يحصل التسمم عندما تلتصق البكتيريا في أغشية الأمعاء الدقيقة وإفرازه لنوع من السم ذو تركيب بروتيني. الجرعة الممرضة لهذه البكتيريا هي أكثر من مليون خلية.

وتنتج بكتيريا ***Vibrio parahaemolyticus*** مركبات محللة للدم تسمى كاناجاوا **Kanagawa Haemolysins** وهذه المركبات أو السموم تقوم بالدور الأساسي في عملية التهاب المعدة والأمعاء أثناء فترة المرض.

ج - بكتيريا ***Vibrio vulnificus***:

تعيش في البيئات البحرية المالحة كما تتواجد في البيئات المائية، مصابات الأنهار، ويترافق مع كثير من الأحياء المائية النباتية والحيوانية العالقة أو الطافية على المياه، الصدفيات والقشريات الهلاميات البحرية مثل المحارات، سرطانات البحر، والأسماك العظمية.

وهي بكتيريا انتهازية ممرضة تسبب التهاب الجروح **Wound infection**، التهاب الجهاز الهضمي، تسمم الدم الأولي. الجروح المفتوحة تتلوث بهذه البكتيريا عند السباحة على الشواطئ البحرية الملوثة. أما تناول البكتيريا عن طريق الأكلات البحرية الملوثة فيسبب التهاب أغشية الجهاز الهضمي المخاطية، أما تناول مثل هذه الأغذية الملوثة من قبل الأشخاص المصابين بأمراض مزمنة مثل تليف الكبد **Cirrhosis**، سرطان الرئة، سرطان الدم، نقص المناعة المكتسب **AIDS**، الأزمة الصدرية، فإن الميكروب يجد طريقه للدم متسبباً في صدمة تسمميه للدم **Septic shock** ينتج عنها الوفاة بشكل سريع في 50 % من هذه الفئة. ومما يجدر الإشارة إليه هو أن 70 % من الحالات ينتج عنها تقرحات جلدية.

الجرعة السامة للأشخاص السليمين لم تحدد بعد حتى الآن، بينما الجرعة السامة للأشخاص المعتلين صحياً أقل من 100 خلية، وتظهر الأعراض بعد 16 ساعة من تناول الغذاء البحري الملوث الغير مطبوخ أو الغير مطبوخ بشكل كافي أو الملوث بعد طبخه بشكل جيد. معدل الوفيات لدى الفئة المعتلة بأمراض مزمنة (تليف الكبد، السكر، سرطان الدم، متلازمة نقص المناعة المكتسب، الأزمة الصدرية، ...الخ) تصل إلى حوالي 50 % .

بكتيريا *V. parahaemolyticus* تسبب إسهالاً شديداً بينما بكتيريا *V. vulnificus* تسبب إسهالاً خفيفاً ولكن لدى بعض الأشخاص المصابين بأمراض مزمنة أخرى فإنه يسبب لهم إصابات خطيرة في الدم (تسمم الدم). معظم الحالات والأعراض المرضية الناتجة من عدوى الفبريو **Vibriosis** تحدث في المناطق الساحلية وتزداد الحالات في فصل الصيف.

د – <u>أنواع أخرى من بكتيريا *Vibrio spp.*</u>:

هناك أنواع أخرى من هذا الجنس مسئولة عن عدوى الفبريو المنقول عن طريق الغذاء، بعضها يسبب التهاب الجروح أو الأذن وبعضها يسبب التهاب معدي معوي، وتشمل:
V. alginolyticus و *V. furnissii* و *V. hollisae* و *V. mimicus* و *V. fluvialis* و *V. metschnikovii* وغيرها

<u>12- بكتيريا أخرى مسببة للعدوى الغذائية Food infection</u>:

هناك بكتيريا مثل *Aeromonas hydrophila* و *Plesiomonas shigelloides* و *Cronobacter sakazakii* و *Coxiella burnetii* و *Mycobacterium spp.* و *Brucella spp.* و...الخ وجميعها كما ذُكر سابقاً تسبب عدوى غذائية **Food infection**.

الفطريات Fungi ذات الأهمية في الأغذية:-

سبقت الإشارة في الجزء السابق إلى أن البكتيريا من أهم الأحياء المجهرية التي لها علاقة بجودة وسلامة الأغذية، ولا تقل الفطريات أهمية عن البكتيريا في هذا المجال، فهي تتسبب في تلف الأغذية المختلفة، ولبعض أنواعها القدرة على إفراز سموم في الغذاء، ومنها ما يستخدم في إنتاج بعض الأغذية، ولذلك فالفطريات تعد من الأحياء المجهرية التي تشكل أهمية متميزة في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية.

وقد كانت الفطريات قديماً تصنف ضمن المملكة النباتية نظراً لاحتواء خلاياها على جدار خلوي وكانت هي والطحالب والاشنات ضمن مجموعة واحدة يطلق عليها اسم الثالوثيات (المَشَرِيَّات) Thallophyta وهذه الكلمة اللاتينية مشتقة من كلمة Thallus وهي تعني جسم نباتى بسيط لا يحتوي على جذور أو أوراق أو سيقان كما هو حال الفطريات والاشنات و الطحالب، وبقي هذا التصنيف سارياً حتى عام 1969م عندما قام Whittaker بوضع الفطريات في مملكة مستقلة (كما سبق الإشارة إلى ذلك). والفطريات منها ما هو وحيد الخلية Unicellular كالخمائر Yeasts، ومنها ما هو متعددة الخلايا Multicellular كالأعفان Molds (الفطريات الخيطية Filamentous fungi). والفطريات تتميز بقدرتها العالية على تحمل الظروف البيئية المتباينة مقارنة بالأحياء المجهرية الأخرى ولذلك في مسئولة عن تلف بعض الأغذية التي لا تتمكن بقية الأحياء المجهرية كالبكتيريا من النمو فيها كالأغذية الجافة والجبوب وتلك المحفوظة في تراكيز عالية من السكر مثل المربيات. ولذلك سنستعرض في الصفحات التالية أهم الفطريات (خمائر Yeasts وأعفان Molds) ذات الأهمية في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية.

<u>دليل سريع للتعرف على الفطريات في الأغذية:</u>

1 - المستعمرات تتألف من خلايا طليقةٍ متبرْعَمَه، قد تحتوي على ميسليوم غير حقيقي لكنها في الغالب لا تحتوي على ميسليوم حقيقي.. (خمائر Yeasts).

2 - مستعمرات تحتوي على ميسليوم خضري غزير، الكونيدات والجراثيم مَحْمُولة على خلايا خاصّة.. (أعفان Molds).

الشكل رقم (73): يوضح شكل مستعمرات الخمائر والأعفان عند نموها على الأوساط الغذائية.

الخمائر Yeasts ذات الأهمية في الأغذية:-

الخمائر هي فطريات وَحيدُة الخَلِيَّة Unicellular، وهي عبارة عن مجموعة كبيرة غير متجانسة من الأحياء المجهرية، فهناك عدد قليل من الخمائر الصغيرة لا يزيد حجمها عن حجم البكتيريا، لكن معظمها اكبر بمقدار 4 – 24 مره من البكتيريا، ويتراوح قطر خلاياها بين 7 – 10 ميكرون، طولها بين 7 – 100 ميكرون، ويكون الشكل الظاهري لخلايا النوع الواحد من الخمائر ثابت تقريبا، ويعتمد عليه في التعرف عليها وتصنيفها، والخمائر لا تكون خيوطاً (ميسليوم Mycelium) إلا في حالات خاصة، تتكاثر معظم الخمائر خضريا بالتبرعم ولكن قليلا منها يتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط. وخلايا الخميرة لها شكل كروي أو بيضاوي أو قد تكون ليمونية أو كمثرية أو دورقية الشكل أو اسطوانية أو مستطيلة. وتستطيل بعض أنواع خلايا الخمائر مكونة جسما خيطياً حقيقيا أو غير حقيقي Pseudomycelium، ويحيط بالخلية عادة غلاف سيليلوزي يحتوى داخله على السيتوبلازم وفجوات مائية وحبيبات دهنية وحبيبات لخزن النشا، وتحتاج النواة لصبغة خاصة لتوضيحها.

تنتشر الخمائر على نحو واسع في الطبيعة، حيث توجد في أماكن عديدة مختلفة، لكنها اقل انتشارا من البكتيريا، فهي توجد على الأوراق والأزهار والفواكه والحبوب والفطريات المأكولة (مثل عيش الغراب) وفي الطبقات العليا من تربة بساتين الفواكه. وللخمائر استعمالات مفيدة في الأغذية، فهي تخمر الخبز (خميرة الخبز) وتستخدم في الإنضاج السطحي لبعض أنواع الجبن، كما تستخدم في المرحلة الأولى لإنتاج الخل (مرحلة تحويل المواد الكربوهيدراتية إلى كحول)، كذلك تستخدم لأجل الحصول على بعض الإنزيمات مثل الإميليز وبعض المواد الكيمائية الأُخرى، كما أنها تستعمل كغذاء. وتنمو الخمائر في المواد الغذائية الحامضية التي تحتوى على نسبة لا بأس بها من السكر وكذاك وجدت في بعض منتجات الألبان، وبالتالي فإنها قد تتسبب في تلف بعض الأغذية مثل الخضار المخللة وعصير الفواكه والمحاليل السكرية والمولاس والعسل واللّحوم وكثير من المواد الغذائية الأُخرى.

إن مظهر نمو الخميرة المتكتلة ليس في اغلب الأحوال مفيداً في تشخيصها، بالرغم من أن النمو كطبقة رقيقة على سطح الوسط الغذائي يوحي بأن هذا النوع من الخمائر خمائر مؤكسدة (غشائية)، كما أن إنتاج صبغة شبه كاروتينية يدل علي جنس معين هو جنس ***Rhodotorula***، ومن ناحية ثانية يكون مظهر النمو مهما عندما يسبب بقعا ملونة على الأغذية ومن الصعوبة تمييز مستعمرات الخميرة عن مستعمرات البكتيريا على الأطباق الحاوية على الأوساط الزرعية الصلبة، فالطريقة الوحيدة المؤكدة هي بوساطة الفحص المجهري للمستعمرات. فمعظم مستعمرات الخميرة اليافعة تكون رطبة ولزجة بعض الشيء ولكن تبدو سهلة التفتت Mealy، وتكون معظم

المستعمرات ماثلة للبياض، ولكن بعضها اصفر فاتح اللون أو وردي. وتتغير بعض المستعمرات قليلا بتقدم العمر، ولكن البعض الأخر تصبح جافة ومجعدة. ويمكن أن تكون الخمائر إما مخمرة أو مؤكسدة أو كليهما، ويمكن أن تنمو الخمائر على هيئة غشاء أو زَبَد Scum على سطح السائل وبالتالي تسمى الخمائر السطحية أو الغشائية Top or Film Yeasts، ومعظم نواتجها غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2. أما الخمائر المخمرة والتي تعرف بخمائر القاع Bottom Yeasts فإنها تنمو داخل البيئة السائلة وتتميز بإنتاجها للكحول الإثيلي مع تكوين غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2. وتقوم الخمائر الغشائية بصفة عامة بأكسدة الأغذية الحاوية على السكريات والكحول والأحماض العضوية منتجة منها غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 وبعض التغير في هذه الأغذية من ناحية الطعم والرائحة والشكل وتسمى مثل هذه الخمائر الكاذبة (False Yeasts) وأحيانا يطلق عليها (Wild Yeasts). أما الخمائر المخمرة فهي ذات أهمية كبيرة في صناعة الخبز والإنتاج الصناعي للكحول الإثيلي وتسمى الخمائر الحقيقية (True Yeasts).

<u>وتتكاثر الخمائر بالطرق التالية:</u>

أولاً- <u>التكاثر الخضري والجراثيم اللاجنسية:</u>

١- التبرعم إما القطبي Polar أو متعدد الجوانب Multilateral، هو الطريقة الأكثر شيوعا لتكاثر الخمائر خضريا، وفي هذه العملية يبرز البروتوبلازم خارج جدار الخلية، ويكبر البروز في الحجم ويحاط بجدار ثم ينفصل في النهاية كخلية خميرة جديدة، وتنقسم المادة النووية المتضاعفة بين الخلية الأم والخلايا الجديدة، وفي بعض الخمائر وبالأخص الخمائر الغشائية يبدو البرعم ناميا من بروز يشبه الأنبوبة من الخلية الأم.

٢- الانقسام الثنائي البسيط ويشبه عملية الانقسام البسيط في البكتيريا حيث تستطيل خلية الخميرة قليلا ثم يجرى الانقسام النووي، وتنقسم الخلية إلى خليتين كل منهما تحوى نواه وسايتوبلازم.

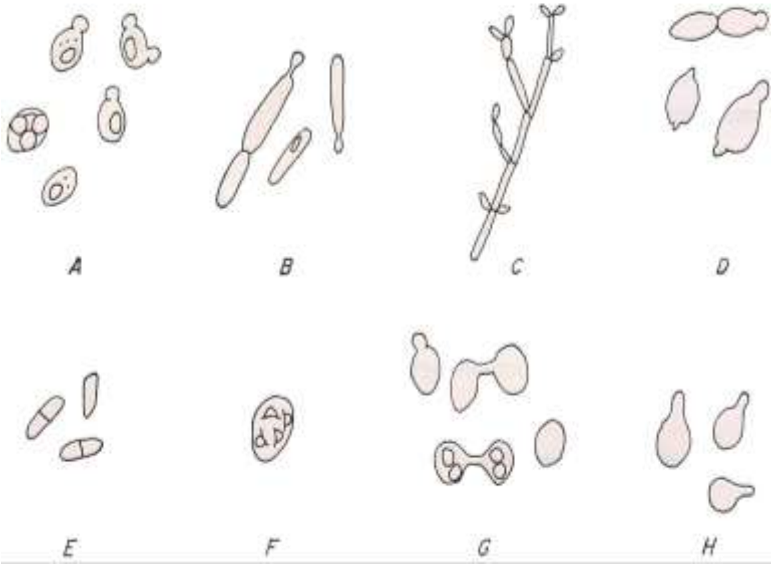
٣- تكون الجراثيم الكلاميدية Chlamydospores، ويحدث ذلك في المزارع القديمة، وتكون جدران خلايا بعض الخمائر سميكة وتصبح هذه الخلايا ممتلئة بالمادة الغذائية وتبقى في طور السكون. تقاوم هذه الجراثيم الجفاف أكثر من خلايا الخمائر الخضرية، وعندما تتوفر الظروف الملائمة للنمو فان هذه الجراثيم الكلاميدية تنمو مكونة خلية خضرية واحدة جديدة بدون تكاثر.

٤- تكون الجراثيم المتبرعمة Blastospores، حيث تُكوّن بعض الخمائر التي لها ميسليوم جراثيم بيضاوية أو كروية في نهاية الهيفا شبيهة بالبرعم.

٥- تكون الجراثيم المفصلية Arthrospores، حيث تتشكل في الخمائر التي لها مايسليوم، في نهاية الهيفا وهى ذات نهاية مربعة.

ثانياً- التكاثر الجنسي:

يتنتج عنه في الخمائر الحقيقية (الفطريات الزقية **Ascomycota**) جراثيم زقية **Ascospores** بحيث تؤدي خلية الخميرة دور الكيس الزقي **Ascus**، وفي معظم أنواع الخمائر الحقيقية يسبق تكوين الجراثيم الزقية اقتران (**Conjugation**) خليتين إلا أن بعضها قد يعطي جراثيم زقية بدون اقتران، ثم يتبعه اقتران جراثيم زقية أو خلايا بنيوية صغيرة. ويعد عدد الجراثيم في الكيس الواحد ومظهر الجراثيم الزقية من الصفات المميزة لنوع الخميرة. وقد تختلف الجراثيم الزقية بلونها ورقة أو خشونة جدرانها وشكلها (مستديرة أو بيضاوية أو كلوية أو منجليه الشكل أو على شكل قبعة أو نصف كروية أو مضلعة أو مغزلية أو إبرية الشكل).



(A) خمـــائر *Saccharomyces cerevisiae* مع خـــلايا متبرعمة وكيس واحد **ascus** به أربعة جـراثيم زقية، (B) خمـــائر *Candida* ذات خلايا طويلة، (C) خميرة *Candida* كوّنت ميسليوم كـــاذب **pseudomycelium**، (D) خمائر ليمونية الشكل **Apiculate (lemon-shaped)**، (E) خمائر *Schizosaccharomyces* تتكاثر بالإنشطار الثنائي البسيط، (F) خمائر *Hansenula* ذات جراثيم زقية لها شكل القبعات المستديرة (**derby-hats**)، (G) خمائر *Zygosaccharomyces* تبين التزاوج (اقتران خليتين**Conjugation**) وكيس به أربعة جراثيم زقية، (H) خمائر دورقية الشكل (**flask-shaped**).

شكل رقم (74) يوضح الأشكال المختلفة للخمائر، عن (**Frazier and Westhoff, 1997**).

الصفات الفسيولوجية للخمائر:

تختلف الخمائر في صفاتها الفسيولوجية بشكل كبير، إلا أن للخمائر ذات الأهمية في الأغذية لها صفات فسيولوجية مشتركة تكفي للتعميم، مع وجود بعض الشذوذ لهذا التعميم. فمعظم الخمائر ذات الأهمية في الأغذية تحتاج لنموها إلى وجود كميات كبيرة من الرطوبة (بعكس الأعفان التي تتمكن من النمو في أغذية ذات نشاط مائي a_w منخفض)، مع العلم بأن الخمائر أقل احتياجاً للماء من البكتيريا، فالعديد من الخمائر تتمكن من النمو بوجود من نسب من المواد

المذابة مثل الملح أو السكر بتركيز أعلى بكثير مما تستطيع أغلب البكتيريا النمو فيه. وتصنف الخمائر نسبة إلى احتياجاتها المائية على أنها اعتيادية إذا كانت لا تنمو في تراكيز عالية من المواد المذابة أما في حال تمكنها من النمو فيها فتصنف كمحبة للتراكيز العالية **Osmophilic**.

أما في ما يخص درجة الحرارة المناسبة لنمو معظم الخمائر، فيتراوح مدى درجات الحرارة المثلى لها بين 25° إلى 30°م، أما درجات الحرارة القصوى لنموها فهي تتراوح بين 35° إلى 37°م، وتتمكن بعض أنواع الخمائر من النمو في درجات حرارة أقل من الصفر المئوي. وتفضل معظم الخمائر النمو في وسط حامضي (pH يتراوح بين 4.0 إلى 4.5)، وهي لا تنمو في الأوساط القاعدية ما لم تكن متكيفة لذلك. والخمائر تنمو بصورة جيدة في الظروف الهوائية، لكن الأنواع المخمرة منها تستطيع النمو لاهوائياً. وتعد السكريات بصورة عامة أحسن مصادر الطاقة بالنسبة للخمائر، بالرغم من أن الخمائر المؤكسدة مثل الخمائر الغشائية **Film Yeasts** تؤكسد الأحماض العضوية والكحول. ويسبب غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 المنتج من قبل خميرة الخبز انتفاخه، كما أن الكحول الناتج عن الخمائر المخمرة هو الناتج الأساسي في تصنيع المشروبات الكحولية (المحرمة في الإسلام) والكحول الصناعي ونواتج أخرى. وتتفاوت المصادر النتروجينية التي يمكن استخدامها من قبل الخمائر من المركبات النتروجينية البسيطة مثل الأمونيا واليوريا إلى الأحماض الأمينية والببتيدات المتعددة، كما وأن الخمائر قد تحتاج إلى عوامل نمو إضافية.

وقد تتعرض الصفات الفسيولوجية للخمائر للتغير، وخصوصاً الخمائر الزقية **Ascomycota**، ويمكن استغلال ذلك للحصول على خصائص فسيولوجية معينة مفيدة في المجالات الصناعية، فالخمائر يمكن أن تُطَفر إلى أشكال جديدة، كما يمكن لمعظم الخمائر أن تتطبع أو تتكيف لظروف صعبة غير مناسبة لنموها بحيث تتمكن من النمو فيها بعد عملية التكيف **Adaptation**، ومن أهم الأمثلة لذلك وجود عدد كبير من السلالات المختلفة لخميرة ***Saccharomyces cerevisiae*** الملائمة لاستخدامات مختلفة مثل السلالات الخاصة بصناعة الخبز والسلالات الخاصة بإنتاج المشروبات الكحولية الخبيثة بمختلف أنواعها والسلالات الخاصة ذات الإنتاج العالي من الكحول الصناعي.

التعرف على الخمائر:

يعتمد التعرف على الخمائر والتفريق بين أنواعها المختلفة على الصفات التالية:

1- تكوين أو عدم تكوين الجراثيم الزقية **Ascospores**.

2- ففي حالة ما إذا كانت الخمائر مكونة للجراثيم الزقية **Ascospores**، نلاحظ ما يلي:

<u>أولاً</u>. طريقة تكوين الجراثيم الزقية **Ascospores** والتي تكون على إحدى الصور التالية:

أ. بدون اقتران (**Conjugation**) لخلايا الخميرة (عذرية التكاثر **Parthenogenetically**) وقد يتبع ذلك إما اقتران جراثيم زقية أو اقتران خلايا بنيوية صغيرة.

ب. اقتران متشابه الأمشاج Isogamic conjugation حيث تبدو الخلايا المقترنة متشابهة.

ج. اقتران متباين الأمشاج Heterogamic conjugation وتبدو الخلايا المقترنة مختلفة.

ثانياً. مظهر الجراثيم الزقية Ascospores من حيث الشكل والحجم واللون، فمعظم الجراثيم الزقية كروية أو بيضاوية، لكن لبعضها أشكال شاذة مختلفة، مثل تلك التي في معظم أنواع جنس *Hansenula* والتي لجراثيمها الزقية شكل قبعات السباق (Derby hats).

ثالثاً. العدد المألوف للجراثيم الزقية في الكيس الزقي الواحد (واحد أو اثنين أو أربعة أو ثمانية).

3- مظهر الخلايا الخضرية (شكلها، وحجمها، ولونها، ومحتوياتها).

4- طريقة التكاثر اللاجنسي، هل هو بالتبرعم Budding، أو بالانقسام المستعرضِ Transverse fission، أو بكليهما معاً، أو بتكون الجراثيم المفصلية Arthrospores، أو بتكون الجراثيم الكلاميدية Chlamydospores، أو الجراثيم المتبرعمة Blastospores.

5- إنتاج ميسليوم Mycelium حقيقي أو غير حقيقي Pseudomycelium، أو عدم إنتاج ميسليوم نهائياً.

6- النمو كطبقة رقيقة على سطح السائل كما في حالة الخمائر الغشائية، أو النمو خلال جميع أجزاء البيئة السائلة.

7- لون النمو المرئي بالعين المجردة.

8- الصفات الفسيولوجية (المستعملة لتمييز الأنواع أو السلالات ضمن النوع الواحد) ومنها:

أ. مصادر النيتروجين والكربون.

ب. المتطلبات اللازمة للنمو من الفيتامينات وعوامل النمو الأُخرى.

ج. طبيعة الخمائر، مخمرة أو مؤكسدة أو كليهما، حيث أن الخمائر الغشائية تكون مؤكسدة، أما الخمائر الأُخرى فهي يمكن أن تكون مخمرة أو مخمرة ومؤكسدة.

د. التحلل الدهني Lipolysis، ونشاط إنزيم اليوريز Urease Activity، وإنتاج الحامض، أو تكوين مركبات شبيهة بالنشا Starch-like Compounds. وغيرها من الصفات الفسيولوجية الأُخرى.

بعض الأمثلة على الخمائر المهمة في مجال الأغذية:

الخمائر المهمة في مجال الأغذية تكون منضوية ضمن شعبة الخمائر الزقية **Ascomycota** (وتشمل أيضاً الخمائر الناقصة)، كما تكون منضوية أيضاً ضمن شعبة الخمائر البازيدية **Basidiomycota**. إن معظم الخمائر المهمة في مجال الأغذية والمستعملة صناعياً من شعبة الخمائر الزقية **Ascomycota** وتتبع التقسيم التالي:

Kingdom: Fungi
Phylum: Ascomycota
Class: Saccharomycetes
Order: Saccharomycetales
Family: Saccharomycetaceae
Genus: ***Saccharomyces, Zygosaccharomyces, Schizosaccharomyces, Hanseniaspora, Debaryomyces, Issatchenkia, Pichia, Kluyveromyces, Torulaspora.***

أما مجموعة الخمائر الناقصة **Deuteromycetes** فتشمل ***Kloeckera*** و ***Brettanomyces*** و ***Candida*** وهي أيضاً أجناس تنتمي لعائلة **Saccharomycetaceae** لكن لم يعرف لها طرق جنسية للتكاثر ولذلك يطلق عليها اسم الخمائر غير الحقيقية **False Yeasts**. في حين أن الخمائر المهمة في الأغذية ضمن شعبة الخمائر البازيدية **Basidiomycota** تتمثل في ***Cryptococcus*** و ***Rhodotorula*** و ***Trichosporon*** وهي تنتمي إلى أقسام ورتب وعوائل مختلفة.

دليل عام للتعرف على بعض الخمائر المهمة في مجال الأغذية:

1 (أ)- المستعمرات على بيئة أجار مستخلص المَلْت وردية أَو حمراء .... (***Rhodotorula***).

1 (ب)- المستعمرات على بيئة أجار مستخلص المَلْت (MEA) ذات لون أبيض أو أبيض مصفر أو مُسْمَرّ .... (2).

2 (أ)- الخلايا تنقسم بالانقسام المستعرضِ .... (***Schizosaccharomyces***).

2 (ب)- الخلايا تنقسم بالتَبَرْعُم .... (3).

3 (أ)- تنمو على بيئة أجار مَلْت الخميرة 10% ملح و 12% جلوكوز (MY10-12) .... (4).

3 (ب)- لا تنمو على بيئة (MY10-12) .... (6).

4 (أ)- الخلايا تقريباً كروية الشكل .... (***Debaryomyces***).

4 (ب)- الخلايا إهليجية إلى مُتَطَاوِلة .... (5).

5 (أ)- تنمو على بيئة أجار تشابيك، وجراثيمها الزقية لها شكل القبعة .... (***Pichia***).

5 (ب)- لا تنمو على بيئة أجار تشابيك، وجراثيمها الزقية ملساء الجدار .... (***Zygosaccharomyces***).

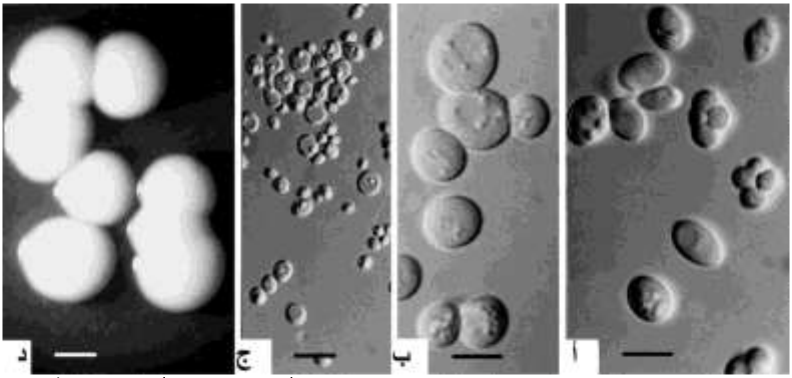
6 (أ)- تنمو على بيئة أجار المَلْت والخلات (MAA) .... (7).
6 (ب)- لا تنمو على بيئة أجار المَلْت والخلات (MAA) .... (11).
7 (أ)- تنمو على بيئة أجار مَلْت الخميرة 50% جلوكوز (MY50G) .... (8).
7 (ب)- لا تنمو على بيئة أجار مَلْت الخميرة 50% جلوكوز (MY50G) .... (9).
8 (أ)- تنمو بشكل جيد على درجة 37°م .... (*Candida*).
8 (ب)- لا تنمو على درجة 37°م .... (*Zygosaccharomyces*).
9 (أ)- طول الخلايا في الغالب 4 – 6 ميكرومتر، ونموها على درجة 37°م ضعيف على الأغلب .... (*Pichia*).
9 (ب)- طول الخلايا في أغلب الأحيان يتَجَاوِز 6 ميكروميتر، ونموها على درجة 37°م قوي .... (10).
10 (أ)- الخلايا الكبيرة اسطوانية تصل إلى 25 ميكروميتر، مستعمراتها النامية على أجار مستخلص المَلْت (MEA) عند درجة 28°م قطرها في الغالب يتَجَاوِز 5 ميليمتر .... (*Candida*).
10 (ب)- الخلايا الكبيرة إهليجية نادراً ما تتجَاوِز 12 ميكروميتر، مستعمراتها النامية على أجار مستخلص المَلْت (MEA) عند درجة 28°م قطرها لا يتَجَاوِز 5 ميليمتر .... (*Saccharomyces*).
11 (أ)- تنمو على درجة 37°م .... (12).
11 (ب)- لا تنمو على درجة 37°م .... (13).
12 (أ)- مستعمرات بيضاء شكل الخلايا إهليجي ضيق طولها 4 – 7 ميكروميتر، مستعمراتها على بيئة MEA عند درجة 28°م قطرها لا يتَجَاوِز 2,5 ميليمتر .... (*Brettanomyces*).
12 (ب)- مستعمرات بيضاء مِصفرة إلى كريمية، شكل الخلايا إهليجي ضيق إلى واسع وأطول من 7 ميكروميتر، مستعمراتها على بيئة MEA عند درجة 28°م قطرها أكبر من 2,5 ميليمتر .... (14).
13 (أ)- خلايا إهليجية ضيقة، والخلايا أكبر من 10 ميكروميتر موجودة غالباً...... (*Candida*).
13 (ب)- خلايا إهليجية واسعة طولها 5 – 12 ميكروميتر .... (*Saccharomyces*).
14 (أ)- لا تنمو على بيئة أجار مَلْت الخميرة 50% جلوكوز (MY50G) .... (*Kloeckera*).
14 (ب)- تنمو على بيئة (MY50G) .... (*Zygosaccharomyces*).

1- الجنس *Saccharomyces*:

خلايـا هـذا الجـنس كرويـة الشـكل أو بيضـاوية أو اسـطوانية الشـكل، ويمكـن أن تكـوين الميسـليوم الكـاذب **Pseudomycelium**، تكاثرهـا اللاجنسـي يـتم بـالتبرعم المتعـدد الجوانـب **Multilateral**. أما التكاثر الجنسي فيحدث بواسطة الجراثيم الزقية والذي قد يلي الاقتران، أو بتكوين خلايا ثنائية المجموعة الكروموسومية **Diploid**،عندما تمثل تلك الخلايا الطور الخضري، ويحتوي الكيس الزقي **ascus** على أربعة جراثيم زقية. سلالات هذا الجنس مخمرة ومؤكسدة. ومن أهم أنواع هذا الجنس ***S. cerevisiae*** المستخدمة في تخمير العجين وصناعة الخبز، كما أن سلالات من هذا النوع تستخدم في صناعة المشروبات الكحولية وكذلك في إنتاج الكحول الصناعي والجليسرول وبعض الإنزيمات كالانفرتيز. وتُقسم أنواع هذا الجنس إلى قسمين هما:

1- خمائر السطح (الخمائر العالية) **Top Yeasts**، وهي الخمائر التي تتجمع خلال النمو وتبقى طافية على سطح البيئة بعد انتهاء عملية التخمر، ومن أهم أمثلتها ***S. cerevisiae***.

2- خمائر القاع (الخمائر المنخفضة) **Bottom Yeasts**، وهي الخمائر التي تنزلق إلى قاع جهاز التخمير بعد فترة من النشاط، ومن أهم أمثلتها ***S. carlsbergensis***.

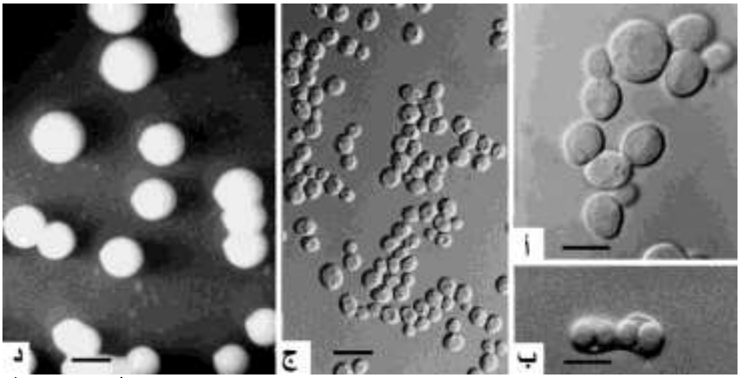


شكل رقم (75) صور لخميرة ***Saccharomyces cerevisiae***، (أ) الجراثيم والأكياس الزقية، (ب، ج) خلايا خضرية، (د) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **MEA**، عن **(Pitt and Hocking, 2009)**.

2- الجنس *Zygosaccharomyces*:

قـد يعتبـر بعـض البـاحثين هـذا الجـنس بأنـه تحـت جـنس **Subgenus** لجـنس ***Saccharomyces***، تتكـاثر أنـواع هـذا الجـنس بـالتبرعم المتعـدد الجوانـب، والجـراثيم الزقيـة المتكونة تكون كلوية الشكل (على شكل حبة الفاصوليا) وهي بشكل عام حرة داخل الكيس الزقي. وتشتهر أنواع هذا الجنس بقدرتها على النمو في التراكيز العالية من السكر، وتسبب فساد العسل والمحاليل السكرية المركزة والمولاس، كما وتتسبب في مشاكل أثناء تخمر صلصة فول الصويا وبعض المشروبات الكحولية. ومن أكثر أنواع هذا الجنس سيادة النوع ***Z. rouxii*** والذي يتمكن من النمو في وسط ذي نشاط مائي a_w منخفض جداً يبلغ (**0.62**)، ولا يفوقه في ذلك إلا

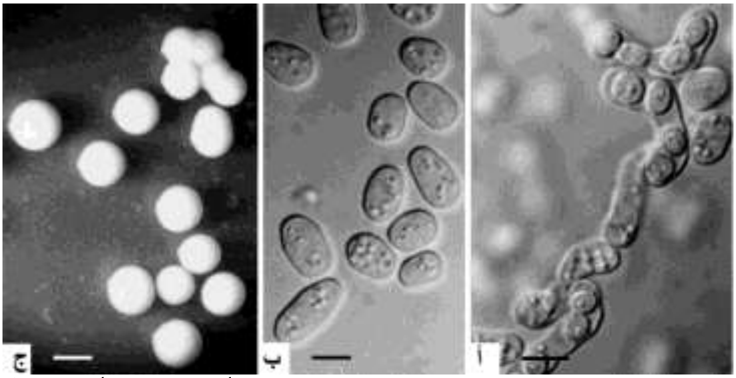
Xeromyces bisporus الذي يتمكن من النمو في وسط ذي نشاط مائي a_w أقل من ذلك. وبعض أنواع هذا الجنس لها علاقة بصناعة بعض الأغذية المتخمرة الشرقية مثل Shoyu و MIso، وبعض أنواعه الأُخرى تتسبب في فساد المايونيز وصلصة السلطة وخصوصاً *Z. bailii* الذي يمكن أن ينمو في وسط شديد الحامضية يبلغ رقمه الهيدروجيني pH ما يساوي (1.8)، وقد تم عزل *Z. nussbaumeri* من عسل النحل.



شكل رقم (76) صور لخميرة *Zygosaccharomyces rouxii*، (ب) الجراثيم والأكياس الزقية، (أ، ج) خلايا خضرية، (د) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت، عن (Pitt and Hocking, 2009).

3- الجنس *Schizosaccharomyces*:

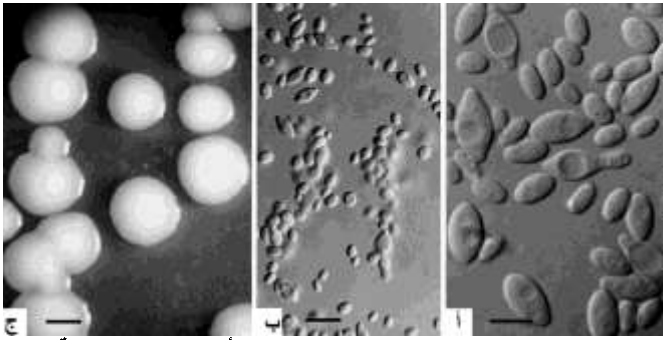
يتميز هذا الجنس بأن خلاياه اسطوانية أو بيضاوية أو كروية الشكل، وتكاثر اللاجنسي في هذا الجنس يتم بالانقسام المستعرضِ Transverse fission، مع تشكيل جراثيم مفصلية Arthrospores. ويتكون الكيس الزقي من خليتين خضريتين، ويحتوي على أربعة إلى ثمانية جراثيم زقية. سلالات هذا الجنس تكون مخمرة ومؤكسدة، ولا تستخدم النترات. وتوجد سلالات هذا الجنس غالباً على فواكه المناطق الاستوائية والمولاس والعسل وكذلك التربة. ومن أهم أنواع هذا الجنس *Schizosaccharomyces pombe* التي تنتشر بشكل كبير في صناعة التقطير.



شكل رقم (77) صور لخميرة *Schizosaccharomyces pombe*، (أ) الجراثيم والأكياس الزقية، (ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت، عن (Pitt and Hocking, 2009).

4- الجنس *Hanseniaspora* (*Kloeckera*):

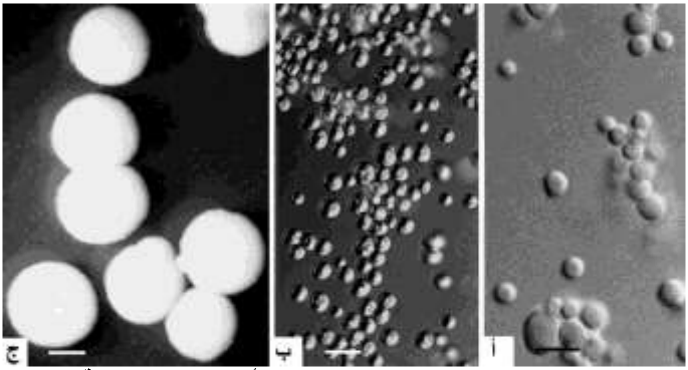
خلايا جنس *Hanseniaspora* ليمونية الشكل **Apiculate (lemon-shaped)**، والطور الناقص (اللاجنسي) **Anamorphs** لهذا الجنس هو *Kloeckera* **spp.** التبرعم في هذا الجنس يكون ثنائي الأقطاب **bipolar** مما يعطي الخلايا شكل ثمرة الليمون، ويحتوي الكيس الزقي **Ascus** على أربعة جراثيم زقية **(4-ascospores)** على شكل قبعة، أو من جرثومة زقية واحدة إلى اثنتين **(1 - 2 ascospores)** لها شكل كروي، وسلالات هذا الجنس مخمرة ومؤكسدة، وهي تنمو في عصائر الفاكهة مسببةً تلفها، كما تتواجد في أنواع أُخرى من الأغذية وخصوصاً التين والطماطم والفراولة وثمار الحمضيات وأثناء تخمر ثمار الكاكاو. ومن الأنواع التابعة لهذا الجنس في طوره اللاجنسي *K. apiculata* وهي تتسبب في تلف عصائر الفاكهة.



شكل رقم (78) صور لخميرة *Kloeckera apiculata*، (أ، ب) خلايا خضرية ليمونية الشكل، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **MEA**، عن **(Pitt and Hocking, 2009)**.

5- الجنس *Debaryomyces*:

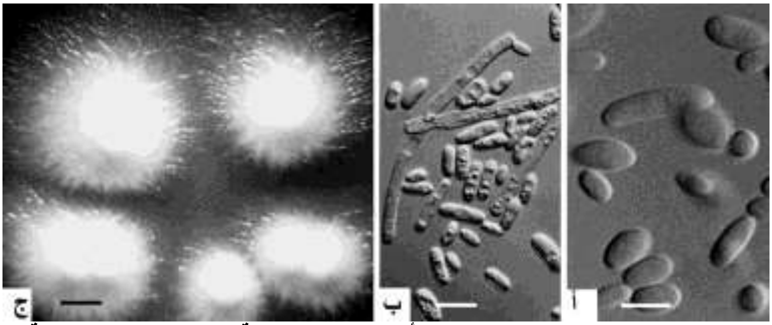
تكون خلايا هذا الجنس ذات شكل كروي في أغلب الأحيان أو بيضاوية، والتبرعم في هذا الجنس يكون متعدد الجوانب **Multilateral**، ومن مميزات هذا الجنس أنه لا يكون الميسليوم الكاذب **Pseudomycelium**. ويتشكل الكيس الزقي **Ascus** من خليتين. بعض أنواع هذا الجنس مؤكسدة فقط، في حين أن بعضها الأخر تكون مخمرة ومؤكسدة في الوقت نفسه. تتحمل أنواع هذا الجنس التراكيز العالية من الملح وأثناء نموها تشكل غشاء على سطح المحاليل الملحية للّحوم والمخللات. من أهم أنواع هذا الجنس *D. kloeckeri* الذي عزل من بعض أنواع الجبن ومن السجق، كذلك *D. hansenii* وهي أكثر أنواع هذا الجنس انتشاراً في الأغذية وقد تم عزلها من الجبن ومواد غذائية أخرى، وأهم ما يميز هذا النوع هو قدرته على النمو في محاليل ملحية يصل تركيز الملح **(NaCl)** فيها إلى **24 %**، كما يمكنها النمو في وسط ذي نشاط مائي a_w منخفض يبلغ **(0.65)**، وتتسبب في تكون طبقات لزجة في بعض أنواع السجق، وهي من أسباب تلف الزبادي وعصير البرتقال المركز.



شكل رقم (79) صور لخميرة *Debaryomyces hansenii*، (أ، ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **Malt Extract Agar**، عن **(Pitt and Hocking, 2009)**.

6- الجنس *Issatchenkia*:

أنواع هذا الجنس تكون الميسليوم الكاذب، وتتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب. وقد تم تصنيف بعض أنواع الجنس *Pichia* حديثاً ضمن هذا الجنس، والطور التام (الجنسي) Teleomorph لخميرة *Candida krusei* هو *Issatchenkia orientalis*. ويتميز هذا الجنس بالنمو على شكل غشاء رقيق Pellicle في الأوساط السائلة. وتحتوي أنواعه المرافق الإنزيمي Q-7 (Coenzyme Q-7)، وهذا الجنس يكون سائداً في أنواع مختلفة من الأغذية.



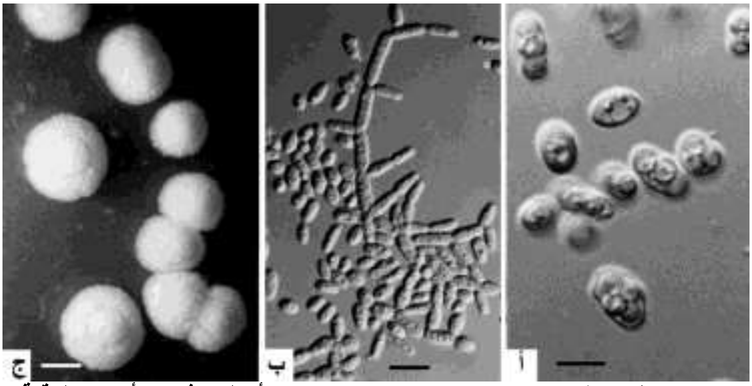
شكل رقم (80) صور لخميرة *Candida krusei*، (أ، ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **Malt Extract Agar**، عن **(Pitt and Hocking, 2009)**.

7- الجنس *Kluyveromyces*:

خلايا هذا الجنس بيضاوية أو اسطوانية الشكل، ويتم التكاثر اللاجنسي بالتبرعم المتعدد الجوانب، وهناك إمكانية لتكوين الميسليوم الكاذب. ويحتوي الكيس الزقي Ascus على عدة جراثيم زقية (أكثر من 16 جرثومة زقية)، ذات أشكال بيضاوية أو هلالية. وتكون سلالات هذا النوع مخمرة ومؤكسدة، ومن أهم أنواع هذا الجنس *K. lactis*، و *K. fragilis* اللذان يملكان القدرة على استخدام اللاكتوز، وقد عزلت هذا الخمائر من الجبن واللبن المتخمر والزبد، كما ترتبط أيضاً بصناعة الكفيير والكوميس وهما نوعان من الألبان المتخمرة الحاوية على الكحول.

8- الجنس *Pichia*:

ويعد الجنس الأكبر ضمن قسم الخمائر الزقية، وخلايا هذا الجنس بيضاوية إلى اسطوانية الشكل، ويمكنها تكوين الميسليوم الكاذب في بعض الأحيان. يتراوح عدد الجراثيم الزقية في الكيس الواحد بين واحد إلى أربعة جراثيم زقية على شكل قبعة. بعض سلالات هذا الجنس مخمرة والأُخرى مؤكسدة ومن أهم أنواعه *P. membranefaciens* التي تُكوّن قشرة رقيقة **Pellicle** على المشروبات الكحولية، وهو الطور الجنسي **Teleomorph** لخميرة *Candida valida*. وبشكل عام فإن أنواع هذا الجنس تُكوّن غشاء رقيق أثناء نموها في الأوساط السائلة، وقد وجدت في السمك الطازج والجمبري، كما بإمكانها أن تنمو على ثمار الزيتون المحفوظة في المحاليل الملحية، وتتسبب في فساد المخللات **pickles**.



شكل رقم (81) صور لخميرة *Pichia membranefaciens*، (أ) الجراثيم والأكياس الزقية، (ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **MEA**، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

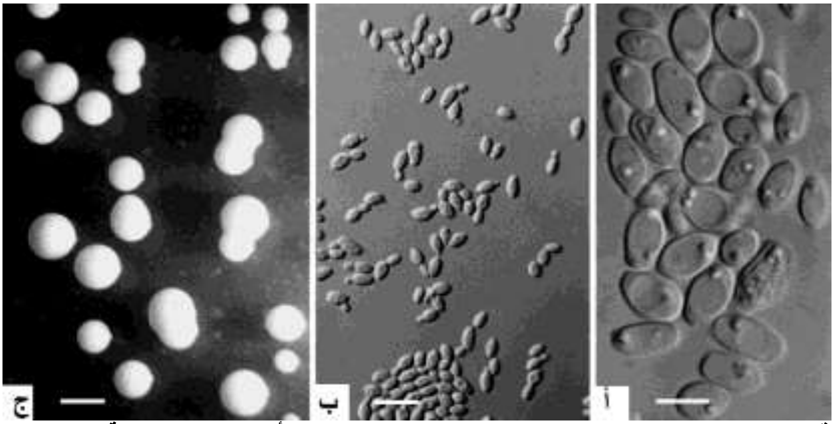
9- الجنس *Torulaspora*:

أنواع هذا الجنس تتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب، والجراثيم الزقية المتكونة داخل الكيس الزقي **ascus** تكون كروية الشكل، ثلاثة أنواع أُحادية المجموعة الكروموسومية **haploid** كانت سابقاً ضمن جنس *Saccharomyces* أصبحت الآن ضمن هذا الجنس. ويتميز هذا الجنس بتخميره القوي للسكريات. وتحتوي أنواعه هذا الجنس على المرافق الإنزيمي **Q-6** (**Coenzyme Q-6**)، ويعد النوع *T. delbrueckii* الأكثر سيادة ضمن أنواع هذا الجنس.

10- الجنس *Brettanomyces*:

من مجموعة الخمائر الناقصة وشكل خلايا هذا الجنس بيضاوية أو كروية أو اسطوانية أو مقوسة. تتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب، ويمكن أن تشكل البراعم ما يشبه السلاسل، ويمكنها تكوين الميسليوم الكاذب في بعض الأحيان. وينتج هذا الجنس حامض الخليك في الظروف الهوائية، كما يقوم بتخمير مستخلص المَلْت (الشعير المنبت **Malt**) معطياً نكهة مميزة. ومن أهم

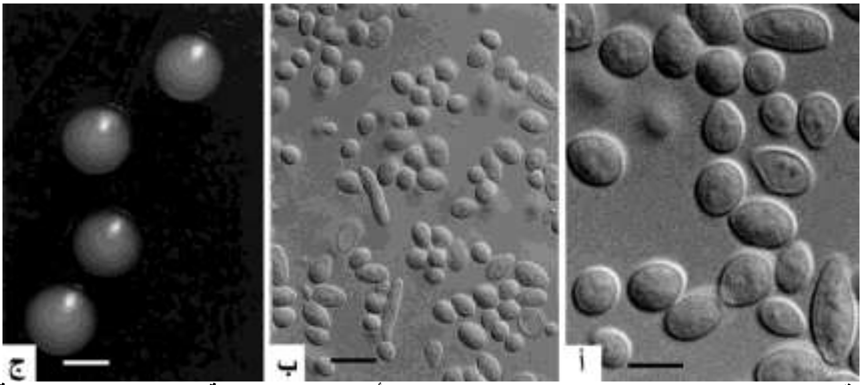
أنواعه وأكثرها انتشاراً في الأغذية *Brettanomyces intermedius* والذي يتمكن من النمو وسط شديد الحامضية يبلغ رقمه الهيدروجيني **pH** ما يساوي (**1.8**). وتتسبب أنواع هذا الجنس في تلف المشروبات الكحولية والمشروبات غير الكحولية والمخللات **pickles** نتيجة إنتاج مركبات فينولية متطايرة تعطي نكهات غير مرغوب فيها (رائحة المواد الطبية). ومن الأنواع الأخرى *B. bruxellensis* التي تلوث المشروبات الكحولية و *B. claussenii* المستخدم في عمليات تخمر ثمار الكاكاو، و *B. naardenensis* المستخدم لإنتاج إنزيمات **α-amylases**.



شكل رقم (82) صور لخميرة *Brettanomyces bruxellensis*، (أ، ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **Malt Extract Agar**، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

11- الجنس *Candida*:

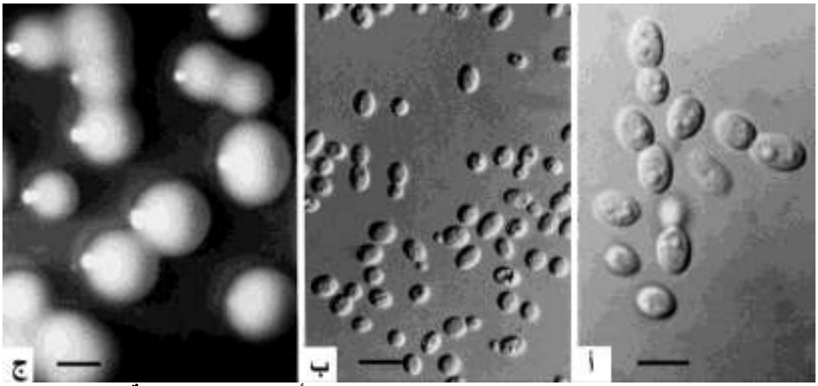
هذا الاسم يعني الأبيض المشرق **Shining white**، ولا تحتوي خلاياه على أصباغ كاروتينية، وتأخذ خلاياه أشكالاً مختلفة كروية أو اسطوانية. تتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب، ويمكنها أن تشكل في بعض الأحيان الميسليوم الحقيقي أو الكاذب والجراثيم الكلاميدية **Chlamydospores**. وتختلف قدرة أنواعه على تشكيل الأغشية والقدرة التخميرية واستخدام النترات من نوع لأخر. كما لها المقدرة على التسبب في تلف المواد الغذائية الحاوية على تراكيز مرتفعة من الملح أو الحامض، ومن أهم أنواعه *C. tropicalis* وهو الأكثر انتشاراً في الأغذية، كذلك *C. lipolytica* var. *lipolytica* الذي عزل من الزبد والسمن النباتي ولهذا النوع القدرة على تحليل الدهون لكنه لا يخمر السكريات، و *C. pseudotropicalis* والذي يؤدي دور مهم في إنضاج أنواع الجبن الطرية، كما يستخدم كخميرة للتغذية، وهناك أيضاً *C. mycoderma* وهذا النوع ذو لون رمادي ويتميز بأنه يقوم بتشكيل أغشية متموجة على سطح البيئات السائلة، يقوم بأكسدة الكحول ويسبب تلف المشروبات الكحولية، و *C. kefyr* وهذا النوع مرتبط بالحليب والجبن والكيفير **Kefir**، وينتج مايسليوم كاذب بكميات كبيرة وهو يخمر اللاكتوز والجلوكوز، إضافة إلى *C. parapsilosis* الذي يتسبب في تلف منتجات الألبان.



شكل رقم (83) صور لخميرة *Candida parapsilosis*، (أ، ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **Malt Extract Agar**، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

12- الجنس *Rhodotorula*:

الجنس ***Rhodotorula*** من الخمائر البازيدية. وخلاياه كروية أو هلالية أو اسطوانية، تتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب، وتمتلك بعض سلالاته كبسولة لزجة، وجميع أنواعه من النوع المؤكسد فقط، وهي تمتلك أصباغ حمراء أو برتقالية أو صفراء، وهي تسبب تلون أسطح اللّحوم والزبد والمخللات، كما تتواجد على لحوم الدواجن والسمك والجمبري وتسبب تلف المواد الغذائية على السكر. ومنها ***R. mucilaginosa*** الذي يسبب تلف جبن التشدر وبعض منتجات الألبان الأخرى، كما يُلوث خميرة الخبز المضغوطة، وفي المقابل يستعمل في تحضير الاغذية الشرقية المتخمرة من فول الصويا، كما يستعمل في انتاج الكتلة الحيوية **Biomass** اعتماداً على الكحول الإيثيلي كمصدر للكربون، وكذلك ***R. rubra*** التي تستخدم في إنتاج الحامض الاميني فينل ألانين و ***R. minuta*** المستخدمة أيضاً في إنتاج الفينل ألانين وحامض البنتاثونيك (**Vit. B_5**)، وأيضاً ***R. glutinis*** و ***R. graminis*** المستخدمتان في إنتاج الدهون الميكروبية **Single cell oil**.



شكل رقم (84) صور لخميرة *Rhodotorula mucilaginosa*، (أ، ب) خلايا خضرية، (ج) مستعمرات نامية على بيئة أجار مستخلص المَلْت **Malt Extract Agar**، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

13- الجنس *Cryptococcus*:

يمثل هذا الجنس الطور اللاجنسي Anamorphs لجنس *Filobasidiella* من الخمائر البازيدية Basidiomycetes. يتكاثر بالتبرعم المتعدد الجوانب، ويمكن أن يُكوّن جراثيم مفصلية Arthrospores. أنواع هذا الجنس لا تخمر السكريات، وقد تم عزلها من التربة وبعض النباتات والثمار ومن الأسماك والجمبري ومن اللحم المفروم، والنوع *C. laurentii* يمكن ان يتلف الدواجن المجمدة. وتستعمل هذه الخميرة لإنتاج الكتلة الحيوية Biomass من المولاس، كما تستعمل ايضًا لإنتاج الدهون الميكروبية المعروفة باسم زيت الخلية الواحدة Single cell oil.

14- الجنس *Trichosporon*:

ينتمي ايضاً الى العائلة Cryptococcaceae، وتنتج خلايا هذا الجنس الميسليوم الكاذب Pseudomycelium بشكل كبير. وتتكاثر لاجنسياً بالتبرعم المتعدد الجوانب Multilateral، كما أن بعض أنواعه تكون الجراثيم الكلاميدية Chlamydospores. معظم خلايا هذا الجنس مؤكسدة، لكن بعض أنواعه مخمرة للسكريات بشكل ضعيف. ويكمن عزل أنواع هذا الجنس من اللَّحوم المبردة والمجمدة، واللحم المفروم ولحوم الدواجن وبعض المواد الغذائية الأُخرى. ومن أهم أنواع هذا الجنس وأكثرها انتشاراً في الأغذية *Trichosporon pullulans* ويفرز هذا النوع إنزيم اللايبيز Lipase مما يسبب فساد الأغذية الحاوية على الدهون.

الأعفان Molds ذات الأهمية في الأغذية:-

أن كلمة عفن هي مصطلح شائع يطلق على تلك الفطريات الخيطية المتعددة الخلايا، والتي من السهل ملاحظة مظهر نموها الزغبي أو القطني والذي قد يكتسب ألوان مختلفة حسب لون الجراثيم (السبورات) الفطرية لتلك الأعفان. وعادة يعتبر الغذاء الملوث بالأعفان غير صالح للأكل، حيث أن الكثير من تلك الأعفان تتسبب في تلف المواد الغذائية، والبعض منها لها القدرة على إفراز أنواع مختلفة من السموم الفطرية، لكن هناك العديد من الأعفان أيضاً تستخدم في إنتاج بعض الأغذية على سبيل المثال الأغذية الشرقية المتخمرة (مثل صلصة الصويا والتمبة والشويو والميزو وغيرها من الأغذية المتخمرة الشرقية المنتشرة في جنوب شرق أسيا والصين واليابان وبعض دول العالم الأُخرى)، وبعض أنواع الجبن المنضجة بواسطة الأعفان مثل أنواع الجبن ذات العروق الزرقاء التي يستخدم في تسويتها عفن *Penicillium roquefortii*، إضافة إلى بعض المنتجات اللبنية مثل المنتج المسمى Viili والذي يستخدم في إنتاجه بكتيريا حامض اللاكتيك وعفن *Geotrichum candidum*. كما أن للعديد من الأعفان أهمية كبيرة في إنتاج العديد من المواد التي لها استخدامات مهمة مثل بعض الإنزيمات التي لها أهمية كبيرة في كثيرٍ من تطبيقات صناعة الأغذية وكذلك إنتاج حامض الستريك وغير ذلك مما لا يتسع المجال لذكره هنا.

الصفات الفسيولوجية للأعفان:

من المميزات الرئيسة للأعفان أنها تتمكن من العيش في وجود كميات قليلة من الماء، فهي أقل احتياجاً للماء من الخمائر والبكتيريا. ويتوقف الحد الأدنى من الرطوبة التي تمكن الأعفان من النمو والتكاثر على بعض العوامل مثل طبيعة تلك الأعفان ونوعها، ومقدار تركيز المواد المنحلة خارج الخلية وطبيعة تركيبها، وقد وجد أن نسبة الرطوبة المثالية لنمو الأعفان هي 18%. أما درجة الحرارة المناسبة لنمو الأعفان فيمكن القول بأنها تنمو في مدى واسع من درجات الحرارة، فهي تتمكن من النمو في درجات الحرارة المنخفضة (-5° إلى 10°م)، أما درجات الحرارة المثلى لنمو الأعفان فهي تتراوح بين 25° إلى 30°م، وبالتالي تعتبر غالبية الأعفان من الأحياء المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة، مع الأخذ بعين الاعتبار بأن هناك أنواع معينة من جنس *Aspergillus* تنمو جيداً عند درجات حرارة تتراوح بين 35° إلى 37°م أو أعلى، وهناك أنواع أُخرى تنمو في درجات حرارة أعلى من ذلك وهي من الأعفان المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة، وبشكل عام في حال ارتفاع أو انخفاض درجات حرارة النمو عن المدى الأمثل فإن نمو الأعفان يكون بطيئاً. وقد وجد أن درجة حرارة البسترة تقضي على جميع أنواع الأعفان عدى تلك الأنواع المنتجة للأجسام الحجرية Sclerotia، أو جراثيم بعض أنواع الأعفان المقاومة للحرارة Heat-resistant mold spores، حيث وجد أن هذه الأنواع تقاوم درجات الحرارة المرتفعة، وبذلك فإنها تتسبب في مشاكل كثيرة في الأغذية المعلبة.

والأعفان هوائية بطبيعتها وتحتاج للأوكسجين لنموها وتكاثرها، وتنمو الأعفان بصورة طبيعية في وسط حامضي (pH يتراوح بين 3,5 إلى 4,5)، كما توجد أنواع أخرى من الأعفان تتمكن من العيش في وسط يتراوح رقمه الهيدروجيني pH بين 2 و8,5.

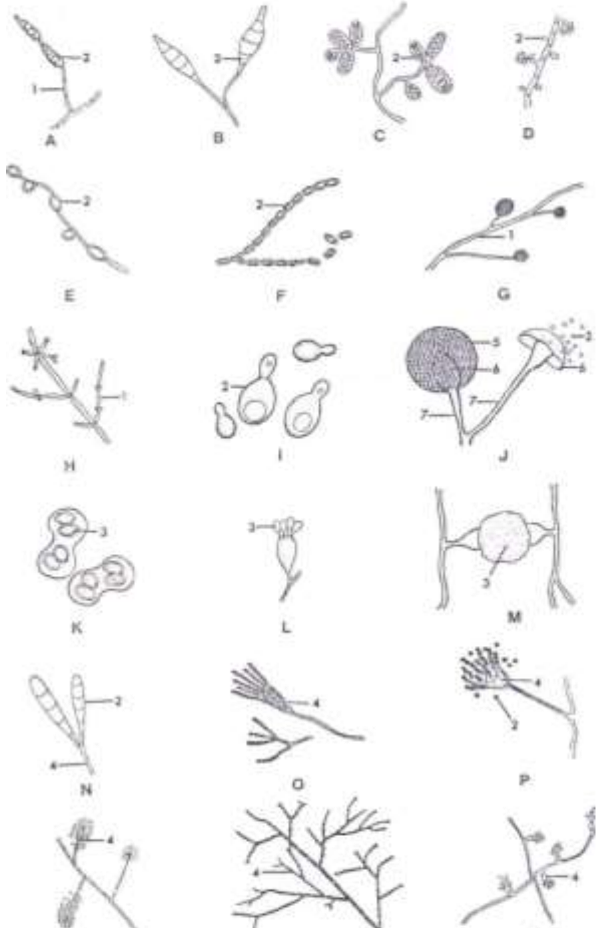
يتميز نمو الأعفان بكونه بطيئا إذا ما قورن بنمو كل من البكتيريا والخمائر، لذلك فان الأعفان لا تنمو بالشكل الملائم عندما تكون الظروف ملائمة لنمو البكتيريا والخمائر. وتتمكن الأعفان من مقاومة الضغوط الاسموزية العالية، فهي بذلك تتحمل أكثر مما يمكن لكل من الخمائر والبكتيريا مقاومته، فتعيش في أوساط غذائية ذو تركيز من السكر يبلغ حوالي 50 - 60 %، ولذلك فإنه في صناعة بعض أنواع المعلبات والكثير من المربيات يتم رفع تركيز السكر فيها إلى ما بين 65 – 70 % تفادياً لنمو الأنواع الأعفان.

الصفات المظهرية (المورفولوجية) للأعفان:

الأعفان عبارة عن فطريات تكون خيوط متفرعة تعرف باسم الميسليوم **Mycelium** أو ما يعرف بالغزل الفطري، والخيط الواحد من الميسليوم يطلق عليه اسم هيفا **Hypha** (مجموعها يدعى هيفات **Hyphae**)، وفي بعض أنواع الأعفان تكون الهيفات عبارة عن اسطوانات متصلة تحتوى على عديد من الأنوية ليس بينها فواصل وفي هذه الحالة تعرف باسم الهيفات غير المقسمة **Non-septate**، وهناك نوع من الفطريات الأُخرى توجد فيها فواصل عرضية تقسم الهيفات إلى سلسلة من الخلايا المنفصلة تحتوى كل واحدة منها على نواة واحدة، وأحيانا تحتوى على نواتين وقد تكون عديدة الأنوية، وعندئذ تعرف هذه الهيفات ذات الفواصل العرضية باسم الهيفات المقسمة. وقد تكون الهيفات مطمورة (نامية داخل المادة الغذائية) أو هوائية(نامية في الهواء فوق المادة الغذائية). ويمكن أن تصنف الهيفات الفطرية كذلك إلى هيفات خضرية (تُعنى بصوره رئيسية بتغذية العفن) وهيفات خصيبة (تُعنى بإنتاج الأجزاء التكاثرية). وتكون الخيوط الفطرية الخصيبة في معظم الأعفان هوائية ولكنها قد نكون مغمورة في بعض الأعفان.

وتنتج أنواع قليلة من الأعفان أجساماً حجرية فطرية **Sclerotia** (مفردها **Sclerotium**)، وهي عبارة عن كتلة متماسكة بشده من خيوط فطرية متحورة ضمن الغزل الفطري وهي غالبا ذات جدران سميكة، وتكون مقاومة إلى حد كبير للحرارة والظروف الأُخرى غير الملائمة مقارنة ببقية الميسليوم الفطري، مما يجعل هذه التراكيب الفطرية ذات أهمية في بعض المنتجات الغذائية المصنعة. وتساعد تراكيب خاصة في الغزل الفطري أو أجزاء منها على تشخيص الأعفان، ومن الأمثلة على هذه التراكيب الخاصة ذلك أشباه الجذور لأجناس ***Rhizopus*** و ***Absidia***، والخلية القاعدية في جنس ***Aspergillus***، والتفرع الثنائي أو شكل حرف **Y** في جنس ***Geotrichum*** وغيرها من التراكيب الخاصة الأُخرى، وتتكاثر الأعفان بأحد طريقتين، الأولى هي طريقة التكاثر اللاجنسي، والثانية هي طريقة التكاثر الجنسي. ويتم التكاثر اللاجنسي إما خضرياً بتجزؤ الهيفات

وانفصالها، ثم ينمو كل جزء منها إلى ميسليوم جديد، أو يحدث ذلك النوع من التكاثر بتكوين جراثيم داخل أكياس خاصة تعرف بالحوافظ الجرثومية **Sporangium**، أو أنها تتكون على حوامل خاصة تعرف بالحوامل الكونيدية **Conidiophore**، أو أنها تتكون من هيفات مباشرة مثل الجراثيم الكلاميدية **Chlamydospore** أو الجراثيم المفصلية **Arthrospore**، أما التكاثر الجنسي فيكون بأشكال مختلفة، وتستخدم الطريقة التي تمت بها تكون الجراثيم الجنسية كأساس في تقسيم وتصنيف الأعفان، وهذه الجراثيم الجنسية متعددة فمنها الجراثيم البيضية **Oospores** (وهذا النوع من الجراثيم الجنسية يكون في الفطريات الطحلبية **Phycomycetes** والتي تشمل الأعفان المائية التي تكون غير مألوفة في الأغذية)، ومنها الجراثيم التزاوجية أو الزيجوتية **Zygospores** ومنها الجراثيم الزقية (الأسكية أو الكيسية) **Ascospores** ومنها الجراثيم البازيدية **Basidospores**. والشكل التالي يوضح أهم الصفات المظهرية للأعفان.



الهيفات Hyphae:
A-1 septate مقسمة
G-1 aseptate غير مقسمة
H-1 Pseudohypha هيفات كاذبة

الجراثيم اللاجنسية Asexual spores:
Macroconidium كونيديات كبيرة
N-2 ،C-2 ،B-2 ،A-2
Microconidium كونيديات صغيرة
P-2 ،D-2
E-2 Chlamydospore جراثيم كلاميدية
F-2 Arthrospore جراثيم مفصلية
I-2 Blastospore جراثيم برعمية
J-2 Sporangiospore جراثيم حافظية

الجراثيم الجنسية Sexual spores:
K-3 Ascospores جراثيم كيسية
L-3 Basidospores جراثيم بازيدية
M-3 Zygospores جراثيم تزاوجية

الحوامل الكونيدية Conidiophore:
N-4 Simple بسيط
O-4, P-4 Complex معقد
R-4 Cladosporium كلادوسبوريوم
S-4 Philalophora حامل قاروري

الحامل الحافظي Sporangiophore:
J-5 Sporangium الحافظة الجرثومية
J-6 Columella العويمد
R-4 Hypha-stalk ساق الهيفا

الشكل رقم (85) يوضح أهم الصفات المظهرية (المورفولوجية) للأعفان، عن (Diliello, 1986).

التعرف على الأعفان: يعتمد التعرف على الأعفان والتفريق بين أنواعها على الصفات التالية:

1- الهيفا (مقسمة septate أو غير مقسمة a septate).

2- جسم العفن (الميسليوم) Mycelium شفاف أو معتم.

3- جسم العفن ملون أو غير ملون.

4- وجود الجراثيم الجنسية (الجراثيم البيضية Oospores أو التزاوجية Zygospores أو الزقية Ascospores أو البازيدية Basidospores).

5- أنواع الجراثيم اللاجنسية (الحافظية Sporangiospore أو الكلاميدية Chlamydospore أو المفصلية Arthrospore).

6- صفات الرؤوس الحاملة للجراثيم وأشكالها في الأعفان.

7- مظهر حوامل الرؤوس الجرثومية (بسيطة أو متفرعة أو مركبة).

8- مظهر الجراثيم اللاجنسية (أحادية، ثنائية أو متعددة الخلايا) مع بيان حجم ولون هذه الجراثيم.

9- وجود أجزاء خاصة تميز أنواعا دون أخرى مثل أشباه الجذور Rhizoids أو العقد Nodes أو الخلايا القاعدية Foot cell أو الأجسام الحجرية Sclerotia.

بعض الأمثلة على الأعفان ذات الأهمية الأغذية:-

الأعفان هي فطريات خيطية حقيقية النواة تتبع مملكة الفطريات Myceteae. وتقسم الأعفان في مجال الأغذية إلى مجموعتين هما مجموعة الأعفان غير مقسمة الميسليوم وتتبع الفطريات الزيجوتية Zygomycetes، وكذلك مجموعة الأعفان مقسمة الميسليوم وتتبع مجموعة مختلفة من الفطريات الزقية Ascomycetes، وتضم مجموعة الفطريات الناقصة Deuteromycetes. وفي ما يلي استعراض لأهم الأعفان في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية.

دليل عامّ للتعرف على مجاميع الأعفان في الأغذية:

1 (أ)- المستعمرات تتألف من خلايا طليقةٍ متبَرْعَمَه، قد تحتوي على ميسليوم غير حقيقي لكنها لا تحتوي على ميسليوم حقيقي.. (خمائر).

1 (ب)- مستعمرات تحتوي على ميسليوم خضري غزير، الكونيدات والجراثيم مَحْمُولة على خلايا خاصّة.. (2).

2 (أ)- الميسليوم بدون حواجز فاصلة (غير مقسم) أو يحتوي على حواجز قليلة جداً، والجراثيم تتكون داخل حوافظ جرثومية Sporangia............................... (Zygomycetes).

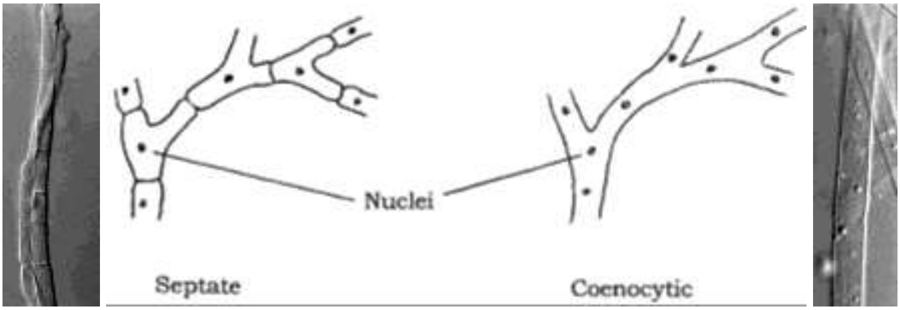
2 (ب)- الميسليوم يحتوي حواجز فاصلة منتظمة.. (3).

3 (أ)- الجراثيم أو الكونيدات لا تتكون داخل كيس زقي Ascus، والكونيدات ليس لها حوافظ جرثومية Sporangia.. (Deuteromycetes).

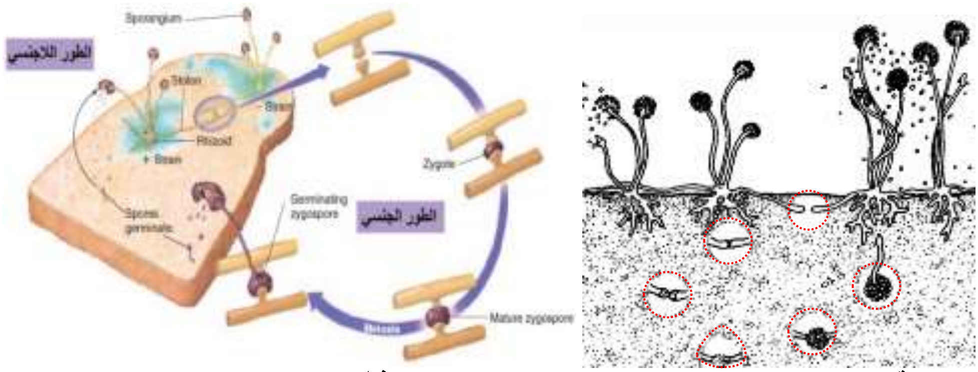
3 (ب)- الجراثيم تتكون داخل أكياس زقية Asci.................................. (Ascomycetes).

<u>أولاً- الأعفان غير مقسمة الميسليوم، وتتبع الفطريات الزيجوتية Zygomycetes:</u>

وفي هذه المجموعة من الفطريات يكون الخيط الفطري (الميسليوم) غير مقسم بفواصل عرضية حيث تغيب الحواجز الفاصلة بين الخلايا ويصبح الميسليوم مدمج خلوي Coneocytic mycelia، يتحرك فيه السيتوبلازم ومحتوياته بما فيها الأنوية من خلية الى أخرى، وتكون الأعضاء الجنسية فيها غير متميزة شكلياً، ويتم الإخصاب بين حافظتين متشابهتين في الشكل والحجم ذات أصل متشابه أو مختلف وينتج عن هذا التزاوج تكوين بَوغٌ (جرثومة) لاقِحيّ Zygospores يكون مقاومة للظروف البيئية الصعبة كما في فطر عفن الخبز *Rhizopus*. بينما تتكاثر لا جنسيا عن طريق تكوين الجراثيم الحافظية Sporangiospores. ومن أهم الأجناس التابعة لها والمرتبطة بالأغذية أجناس *Syncephalastrum* و *Thamnidium* و *Mucor* و *Rhizopus* و *Absidia*.



شكل رقم (86) ميسليوم غير مقسم تغيب فيه الحواجز بين الخلايا Coneocytic (يمين)، وميسليوم مقسم بفواصل عرضية (يسار)، عن (Hogg, 2005)، الصور في الجانبين عن (Pitt and Hocking, 2009).



شكل رقم (87) يوضح عفن الخبز *Rhizopus* والإخصاب بين حافظتين متشابهتين لتكوين Zygospores، عن (Talaro and Talaro, 2002) (يسار).

دليل عام للتعرف على الفطريات الزيجوتية Zygomycetes في الأغذية:

1 (أ)- الجراثيم الحافظية Sporangiospores تتُشكِّل في حافظات جرثومية جزئية تُغلف النهاية المنتفخة للحامل الحافظي Sporangiophore، وفي التكبيرِ المنخفضِ يشبه جنس *Aspergillus* إلا أن الميسليوم غير مقسم .... (*Syncephalastrum*).

1 (ب)- الجراثيم الحافظية تتُشكِّل في حوافظ جرثومية Sporangia كُرَوِيَّة أو كُمَّثرِيَّة الشَّكل مع دعامات (عويمدات) Columella .... (2).

2 (أ)- بالإضافة إلى وجود حوافظ جرثومية Sporangia، يحتوي أيضاً على حويفظات جرثومية Sporangioles... (*Thamnidium*).

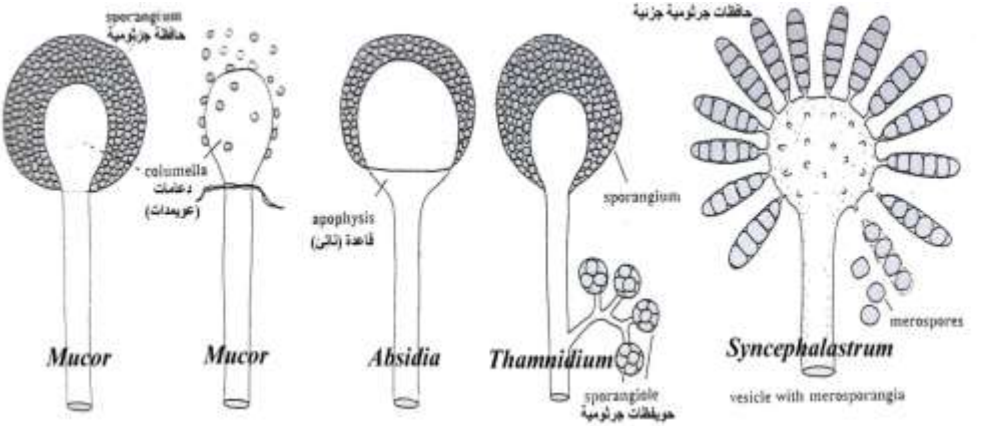
2 (ب)- له حوافظ جرثومية لكن الحويفظات الجرثومية غير موجودة .... (3).

3 (أ)- الحوافظ الجرثومية والحوامل الحافظية في الغالب مُتصبغة بلون داكن، كما أن الحوامل الحافظية في الغالب غير متفرعة ودوماً تظهر في مجاميع وتنشى عند العقد Nodes، قاعدة الحوافظ الجرثومية Apophysis تكون مظلية الشكل، وكل من الجراثيم والحوامل الحافظية فيه تكون محززة (مُخَطَّطة) .... (*Rhizopus*).

3 (ب)- الحوافظ الجرثومية والحوامل الحافظية غير مُتصبغة أو لونها ضعيف، كثيرة التفرع، ولا يتجاوز قُطرها 100 مايكرومتر، والجراثيم غير محززة .... (4).

4 (أ)- الحوافظ الجرثومية كُمَّثرِيَّة الشَّكل لها قاعدة (ناتِئ) Apophysis واضحة تكون قمعية الشكل وحواملها الحافظية ذات جدران ناعمة، وتنشئ هذه الحوامل عند السلاميات (المدادة أو الرئد) Stolon .... (*Absidia*).

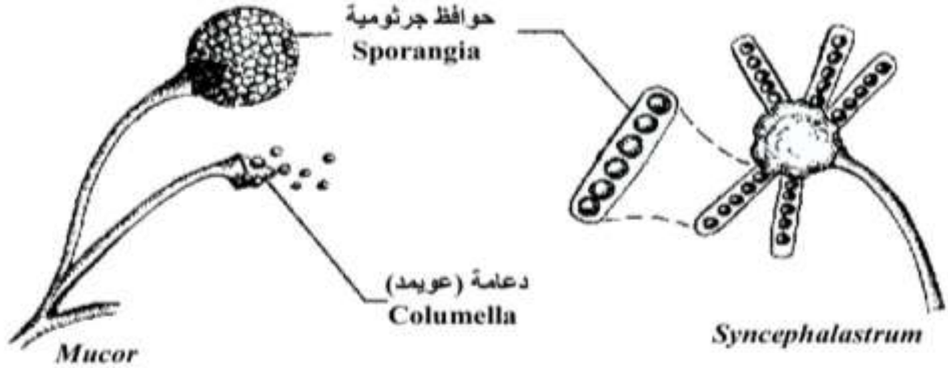
4 (ب)- الحوافظ الجرثومية كُرَوِيَّة الشَّكل، وليس لها قاعدة (ناتِئ) Apophysis واضحة، في الغالب قُطرها أكبر من 40 مايكرومتر، ولا يملك أشباه جذور Rhizoides وسلاميات Stolons... (*Mucor*).



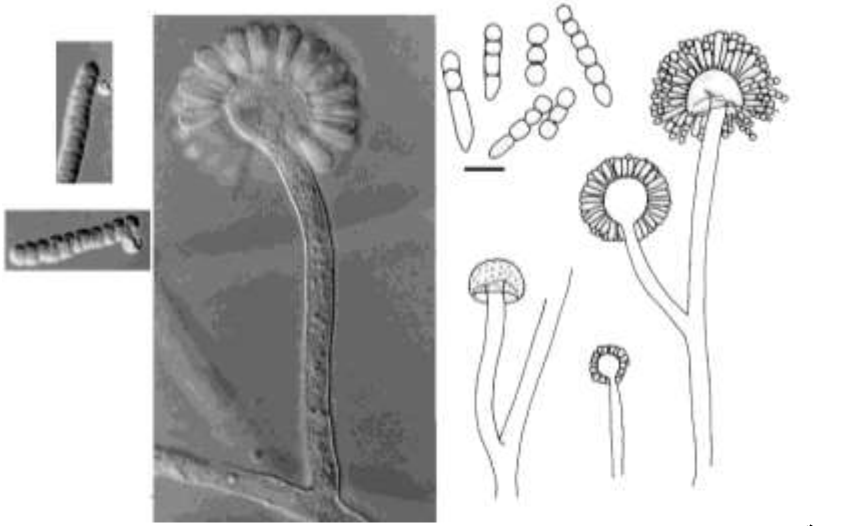
شكل رقم (88) يوضح أهم الصفات المميزة لأجناس *Syncephalastrum* و *Thamnidium* و *Absidia* و *Mucor*، عن (Samson *et al.*, 1995).

1- الجنس *Syncephalastrum*:

من الفطريات الخيطية **Filamentous fungi** ينتمي لعائلة (**Mucoraceae**) يتميز بميسليوم غير المقسم، كما يتميز بأن جراثيمه الحافظية **Sporangiospores** تتُشكِّل في حافظات جرثومية جزئية تُغلف النهاية المنتفخة للحامل الحافظي **Sporangiophore**، ويستخدم ضمن البوادي الخليطة التي تحضر منها (في بعض دول العالم) الاغذية المتخمرة المعدة من الذرة الحلوة والحنطة والمنتجة على هيئة مواد صلبة او سوائل تستعمل كمشروبات او مواد تتبيل اعتمادًا على نوعية وكيفية تحضير المواد والظروف المطبقة في التخمر. ومن أنواعه المعروفة ***Syncephalastrum racemosum*** حيث تشير التقارير إلى تواجده في كل من المكسرات، جوز الهند، الحبوب، التوابل، الأغذية المتخمرة، اللحوم المصنعة، والفلفل الأَحْمَر وغيره.



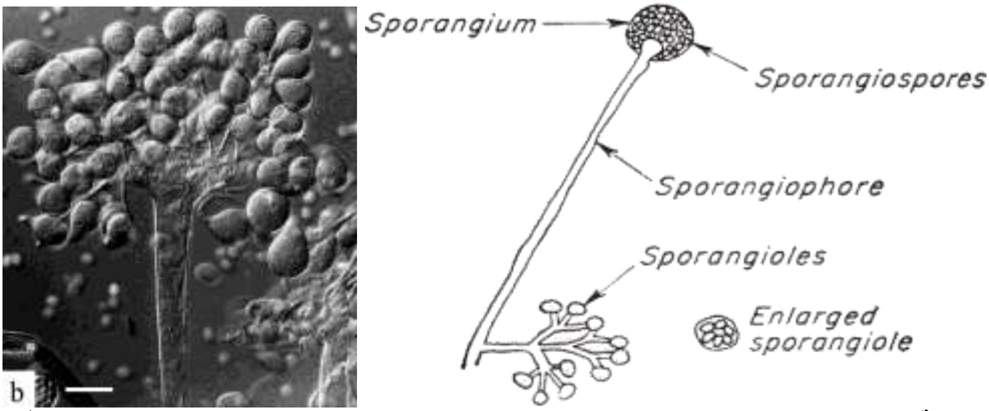
شكل رقم (89) يوضح الجراثيم الحافظية التي تتُشكِّل في حافظات جرثومية جزئية تُغلف النهاية المنتفخة للحامل الحافظي في جنس *Syncephalastrum*، والجراثيم الحافظية المحمولة على دعامات (عويمدات) Columella في جنس *Mucor*، عن (Benson, 2001).



شكل رقم (90) يوضح عفن *Syncephalastrum racemosum*، عن (Pitt and Hocking, 2009).

2- الجنس *Thamnidium*:

يتميز أيضاً بميسليوم غير المقسم، لكنه يملك حوامل حافظيه **Sporangiophore** تحمل حوافظ جرثومية **Sporangia** كبيرة عند القمة وأيضاً تجمعات للحويفظات الجرثومية **Sporangioles** (حوافظ جرثومية مصغرة) قرب القاعدة، تحتوي كل منها على 2 – 12 أو أكثر من الجراثيم **Spores** وتُحمل على نموات خارجية عديدة التفرع تظهر قرب قاعدة الحامل الحافظي. ومن أشهر أنواع هذا الجنس ***Thamnidium elegans*** الذي ينمو على اللّحوم المحفوظة بالتبريد.



شكل رقم (91) يوضح جنس *Thamnidium* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، الحويفظات الجرثومية Sporangioles (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

3- الجنس *Rhizopus*:

أيضاً كباقي أفراد هذه العائلة **Mucoraceae**، يعتبر من الفطريات الخيطية **Filamentous fungi** ذات الميسليوم غير المقسم، لكنه يملك أشباه جذور **Rhizoides** وكذلك السلاميات **Stolons**، والحوافظ الجرثومية **Sporangium** في هذا الجنس كبيرة وسوداء اللون، والدعامات **Columella** شبة دائرية بنية اللون. ويتميز الميسليوم بمظهره القطني، والحوامل الحافظيه **Sporangiophore** ملونة وطويلة وتنتهي على شكل قمع (قاعدة الحوافظ الجرثومية **Apophysis** تكون كاسيه أو مظلية الشكل)، أما الجراثيم فهي ملساء أو محززة.

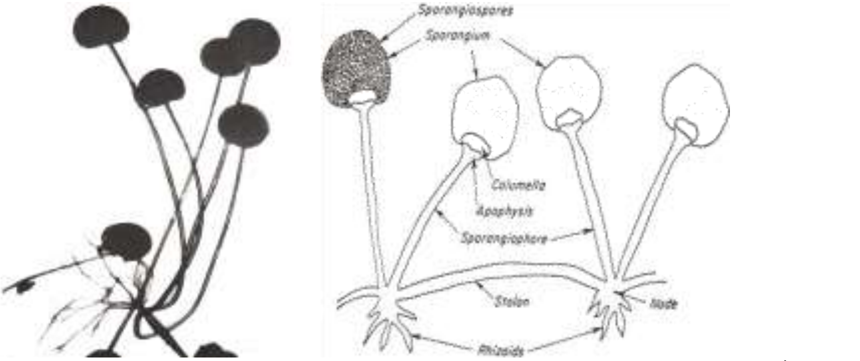
ومن أهم أنواع هذا الجنس في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية:

1- ***Rhizopus nigricans*** (***R.stolonifer***) وهذا النوع يطلق عليه (عفن الخبز) وهو كثير الانتشار ويتسبب في إتلاف الخبز والحبوب والفواكه والخضروات.

2- ***R. arrhizus*** (***R. oryzae***) يتواجد على الحبوب والمواد النباتية في طور التحلل.

3- ***R. oligospotus*** ويستخدم هذا النوع في إنتاج بعض الأغذية الشرقية.

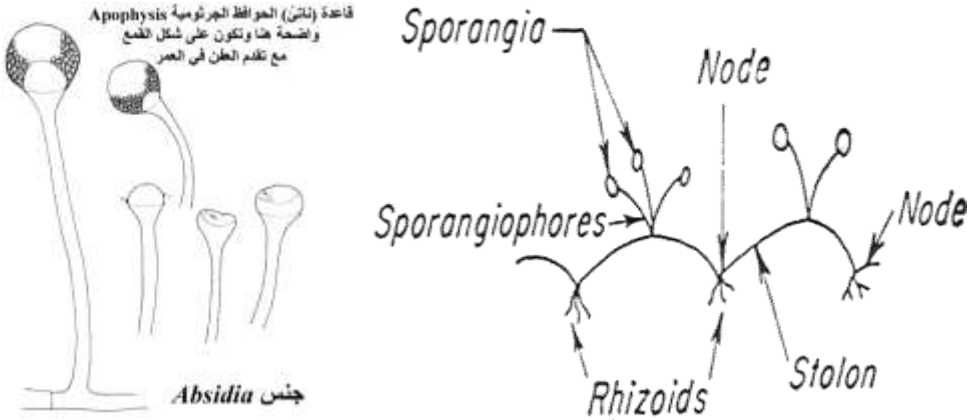
4- ***R. japanicus*** احد انواع الجنس المستعمل لإنتاج البايوتين **Biotin (Vitamin H)**.



شكل رقم (92) جنس *Rhizopus* (يمين)، *R. nigricans* (يسار)، **(Frazier and Westhoff, 1997).**

4- الجنس *Absidia*:

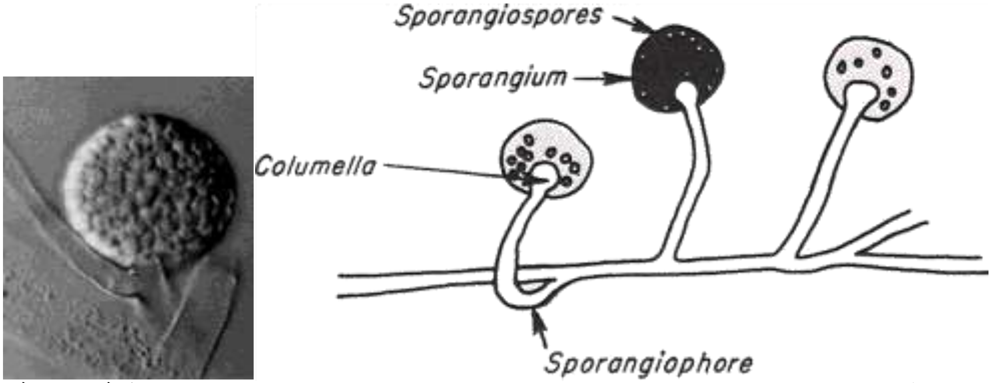
وهذا الجنس يشبه جنس *Rhizopus* ما عدى الحوامل الحافظية فيه والتي تنشى من السلاميات، وتكون الحوافظ الجرثومية صغيرة وكُمَّثرِيُّة الشَّكل لها قاعدة (نـاتِئ) **Apophysis** على شكل قمع. ويضم هذا الجنس أنواع عدة أهمها *A. ramose* الذي يتواجد في الهواء والتربة والحبوب، وهو ممرض للإنسان والحيوان ويسبب التسمم وإجهاض الحيوانات.



شكل رقم (93) نشوء الحوامل الحافظية من السلاميات (يمين)، عن **(Frazier and Westhoff, 1997)**، وقاعدة الحوافظ الجرثومية قمعية الشكل لجنس *Absidia* (يسار)، عن **(Pitt and Hocking, 2009).**

5- الجنس *Mucor*:

وهو أيضاً كباقي أفراد عائلة *Mucoraceae* يتميز بميسليوم غير المقسم ويضم عدد كبير من الأنواع، حوافظه الجرثومية كُرَوِيُّة الشَّكل، وليس لها قاعدة (نـاتِئ) **Apophysis**، جراثيمه ملساء ومنتظمة، لا يملك أشباه جذور ولا خلايا قاعدية لكنه يملك دعامات (عويمدات) **Columella** صغيرة دائرية أو اسطوانية، ويمكن أن يكون الحامل الحافظي **Sporangiophore** بسيطاً أو متفرعاً، ويتكاثر جنسيًا باندماج الامشاج وتكون معلقات الجراثيم التزاوجية فيه متساوية في الحجم **Zygospore suspensors.**



شكل رقم (94) يوضح جنس *Mucor* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، حافظة جرثومية **Sporangium** لعفن *Mucor circinelloides* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

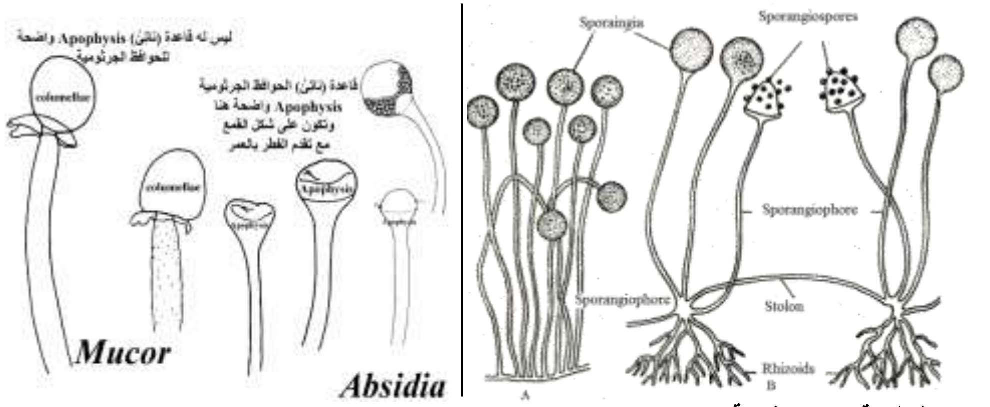
وتفضل اغلب الانواع التابعة للجنس نشاطًا مائيًا عاليًا نوعا ما يصل إلى 0.9، ويتسبب جنس *Mucor* في تلف بعض الأغذية مثل الخبز والمربى والأجبان والمخللات القديمة، إلا أن بعض أنواع هذا الجنس تستخدم في تحضير بعض الأغذية الشرقية، وفي صناعة جبن الجاميلوست **Gammelost**. ومن أهم أنواع هذا الجنس في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية:

1- *Mucor circinelloides* (*M. javanicus*) يستخدم في إنتاج دهون غنية بالحامض الدهني δ-Linolenic acid، كما يستخدم في إنتاج بعض الأغذية الشرقية مثل **Tempeh**.

2- *M.hiemalis* (*M. disperses*) يستخدم في إنتاج **Sufu** (من الأغذية الشرقية) وكذلك في تحضير جبن الصويا وغيرها من المنتجات الغذائية.

3- *M. rouxii* يستخدم في عمليات تحويل النشا إلى جلوكوز فيما يعرف بطريقة **Amylo**.

4- *M. miehei* يستخرج منه إنزيمات شبيهه بإنزيم الرنين تستخدم كبديل له في صناعة الجبن.



شكل رقم (95) مقارنة بين جنسي *Mucor* (A) و *Rhizopus* (B) (يمين)، عن (Jay, 2000)، مقارنة بين جنسي *Absidia* و *Mucor* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

ثانياً - الأعفان المقسمة، الناقصة Deuteromycetes (Fungi Imperfecti):

فطريات مقسمة الميسليوم بفواصل عرضية لم يعرف لها طرق جنسية للتكاثر ولهذا تعرف بالفطريات الناقصة Deuteromycetes، تتميز بأن الحوامل الكونيدية حرة وتنشأ من الميسليوم الذي يكون شفاف أو عديم اللون أو شاحب أو ذو لون براق. ومن أهم أجناسها المرتبطة بالأغذية *Geotrichum* و *Cladosporium* و *Trichothecium* و *Alternaria* و *Fusarium* و *Chrysonilia* و *Aureobasidium* و *Botrytis* و *Acremonium* و *Trichoderma* و *Aspergillus* و *Scopulariopsis* و*Penicillium* و *Paecilomyces*.

دليل عام للتعرف على الفطريات الناقصة Deuteromycetes في الأغذية:

1 (أ)- الجراثيم اللاجنسية جراثيم مفصلية مستطيلة أو بيضاوية .... (*Geotrichum*).
1 (ب)- الجراثيم اللاجنسية عبارة عن كونيدات .... (2).
2 (أ)- الجراثيم اللاجنسية كونيدات ثنائية الخلايا أو متعددة الخلايا .... (3).
2 (ب)- الجراثيم اللاجنسية كونيدات وحيدة الخلية .... (5 – 9).
3 (أ)- الكونيدات الفتية وحيدة الخلية تصبح ثنائية الخلية بتقدم العمر ...... (*Cladosporium*).
3 (ب)- الجراثيم اللاجنسية كونيدات دوما ثنائية الخلايا .... (*Trichothecium*).
3 (ج)- الجراثيم اللاجنسية كونيدات متعددة الخلايا .... (4).
4 (أ)- الكونيدات متعددة الخلايا مرتبطة مع بعضها، أحد طرفيها مستديراً والأخر مدبباً، وتكون ذات لون أخضر مسوّد أو بني قاتم .... (*Alternaria*).
4 (ب)- يمتلك كونيدات كبيرة على شكل المنجل متعددة الخلايا (فاتحة اللون)، كما يمتلك أيضاً كونيدات صغيرة وحيدة الخلية .... (*Fusarium*).
5 (أ)- الكونيدات وحيدة الخلية متبرعمة تشكل رؤوس شجرية الشكل .... (*Chrysonilia*).
5 (ب)- كونيدات وحيدة الخلية تحمل كبراعم جانبية مفردة على الميسليوم (*Aureobasidium*).
5 (ج)- الكونيدات وحيدة الخلية تحمل في تجمعات على قمة الحامل الكونيدي .... (6).
6 (أ)- تجمعات الكونيدات على هيئة عناقيد مفككة على حامل متفرع بغير انتظام ... (*Botrytis*).
6 (ب)- تجمعات الكونيدات على هيئة عناقيد مفككة وهي ملتصقة سوياً على هيئة كرات.. (7).
7 (أ)- الحوامل الكونيدية غير متفرعة .... (*Acremonium*).
7 (ب)- الحوامل الكونيدية عديدة التفرع .... (*Trichoderma*).
8 (أ)- الكونيدات وحيدة الخلية تنشأ على هيئة سلاسل من الذنيبات التي تنشأ من كافة الأجزاء أو من الجزء العلوي للنهاية المنتفخة (الحويصلة) للحامل الكونيدي الذي يبرز من خلية قدمية (Foot cell) .... (*Aspergillus*).
8 (ب)- الكونيدات وحيدة الخلية تنشأ على هيئة سلاسل من الذنيبات التي تكون مفردة أو في مجموعات والرأس الجرثومي يشبه الفرشاة .... (9).

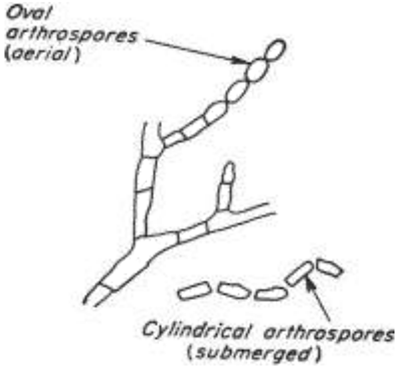
9 (أ)- الذنيبات مفردة، والحامل كونيدي متفرع بغير انتظام، والكونيدات الناضجة مبتورة أَو مُسَطَّحة عند قاعدتها، ومستعمراته بيضاء أو صفراء برتقاليّة أَو بنية .... (*Scopulariopsis*).

9 (ب)- الذنيبات في مجموعات ولها رِقابِ قصيرة، والكونيدات الناضجة كروية إلى إهليجية (بَيْضَوِيّة) الشكل .... (*Penicillium*).

9 (ج)- الذنيبات في مجموعات لها رِقابِ طويلةِ مائلة بعيداً عن محورِ الذنيبة، مُسْتَدقة (متناقصة) بشكل تدريجي، والكونيدة إهليجية إلى مغزليةِ الشكل .... (*Paecilomyces*).

1- الجنس *Geotrichum*:

عفن يمتلك ميسليوم مقسم، وتكون جراثيمه اللاجنسية على هيئة جراثيم مفصلية Arthrospore (اويدات Oidia) تبدو مستطيلة إذا كانت الهيفات مطمورة، كما قد تبدو بيضاوية إذا كانت الهيفات هوائية، وتكون أنواع هذا الجنس مصفرة أو برتقالية أو حمراء. ومن أهم أنواعه *G. candidum* الذي يعرف بعفن الحليب حيث من الشائع وجوده على منتجات الألبان كما أنه يستخدم في بعض البلدان مثل فنلندا مع بكتيريا حامض اللاكتيك في إنتاج منتج لبني متخمر يدعى Viili، ويستخدم لإنتاج انزيم اللايبيز، ويسبب تعفن حامضي للطماطم والحمضيات.

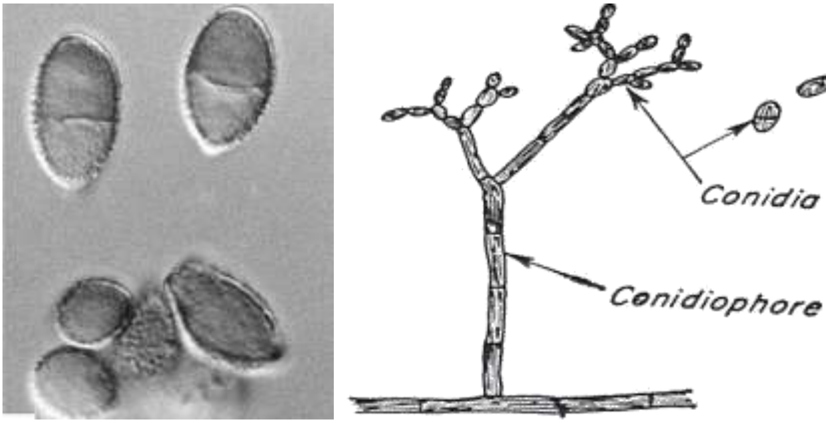


شكل رقم (96) جنس *Geotrichum* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صورة للجراثيم المفصلية Arthrospore لعفن *Geotrichum candidum* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

2- الجنس *Cladosporium*:

يمتلك هذا الجنس كباقي هذه المجموعة ميسليوم مقسم، وتكون الكونيدات الفتية وحيدة الخلية لكنها تصبح ثنائية الخلية بتقدم العمر. تتميز سلالات هذا الجنس عن سلالات جنس *Chrysonilia* الشبيه به بوجود ألوان حيث تكون زيتونية إلى بنية مسوّدة، ملونة في كل أجزائها، مخملية أو خشنة، والكونيدات متفرعة. وتصيب انواع هذا الجنس حبوب القمح في الحقل، ويعد من الفطريات المنتجة للسموم، لكن بعض السلالات التي لا تنتج السموم تستعمل في انتاج بعض الاغذية الشرقية المتخمرة.

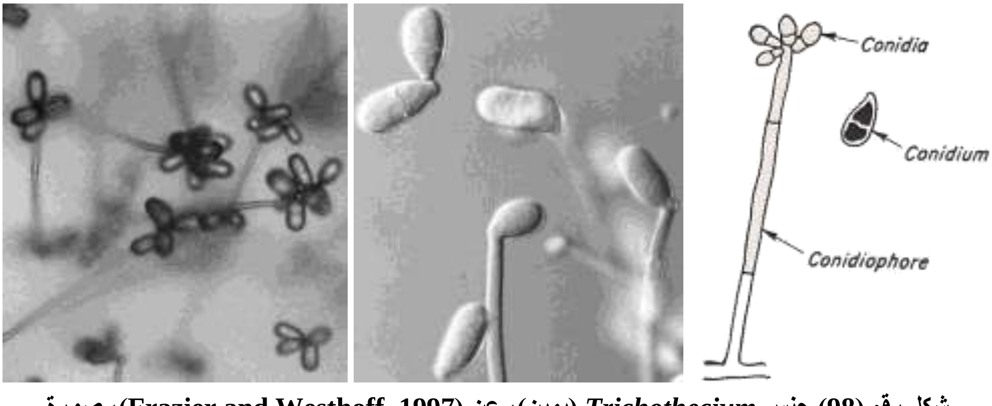
ومن أهم أنواعه *Cladosporium herbarum* الذي ينمو على المواد النباتية في طور التحلل، ويتواجد في الهواء والتربة وكذلك في المواد الغذائية، حيث يتواجد على الحبوب واللّحوم المحفوظة بالتبريد، حيث أنه ينمو في مدى واسع من درجات الحرارة يتراوح بين -6°م و 40°م.



شكل رقم (97) جنس *Cladosporium* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، الكونيدات الفتية (وحيدة الخلية) التي تصبح ثنائية الخلية بتقدم العمر (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

3- الجنس *Trichothecium*:

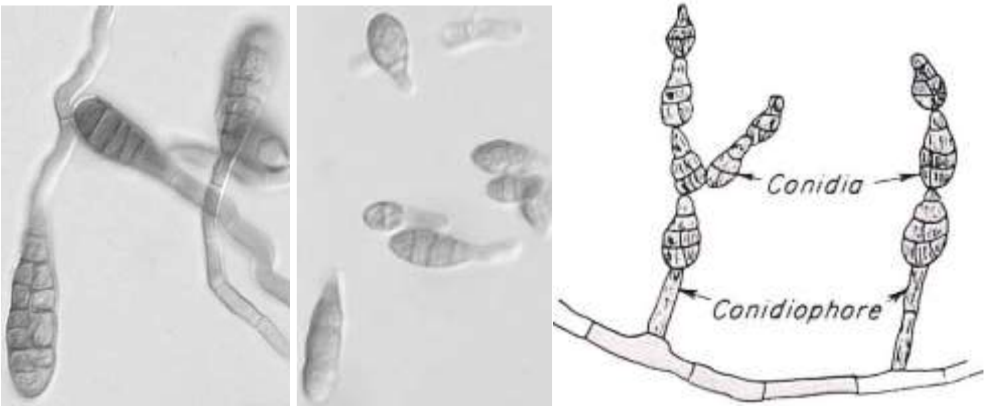
عفن سريع النمو، يمتلك حوامل كونيدية **Conidiophores** منتصبة غير متفرعة تنتهي مباشرة بسلسلة من الكونيدات المتشكلة بشكل منحرف وتصبح قصيرة بتتابع التبوغ أكثر فأكثر. والكونيدات ثنائية الخلايا شفافة وملساء، ومن أهم أنواعه *Trichothecium roseum* وهو عفن محب للماء **Hydrophilic mold** يتواجد بشكل واسع في التربة والحبوب والفول السوداني وبعض المواد الغذائية الأُخرى، ويعد أحد العوامل المسببة للتعفن المر في التفاح وبعض الفواكه أثناء التخزين، كما يسبب فساد الخضروات خصوصاً الخيار. وهذا النوع يفرز السم الفطري **Trichothecine**.



شكل رقم (98) جنس *Trichothecium* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صورة للكونيدات الشفافة الملساء ثنائية الخلايا (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

4- الجنس *Alternaria*:

الميسليوم المقسم يكون قطني المظهر. الحوامل الكونيدية **Conidiophores** معتمة، بسيطة قصيرة إلى حد ما أو مستطيلة تحمل سلسلة من الكونيدات متعددة الخلايا مرتبطة مع بعضها بواسطة الأطراف التي يكون أحد طرفيها مستديراً والأخر مدبباً. وتكون الهيفات شفافة تقريباً في حين أن الكونيدات ذات لون أخضر مسوّد أو بني قاتم. يحتوي هذا الجنس على العديد من الأنواع التي تتسبب في إحداث الفساد للعديد من المواد الغذائية مثل الجبن و الطماطم والفلفل والبطاطا والتفاح والكمثرى والحمضيات. وهو من الفطريات المنتجة للسموم التي تعرف اجمالاً باسم سموم الألترناريا **Alternaria toxins**، ومما يزيد من خطورته في مجال الاغذية هو اتلافها للاغذية المحفوظة تحت التبريد، ومن الأمثلة على أنواعه ***Alternaria citri*** الذي ينمو على ثمار الحمضيات ويسبب فسادها.

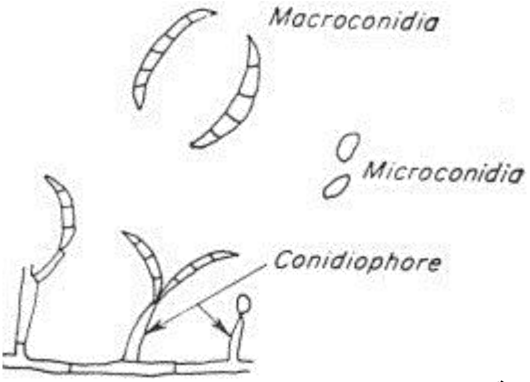


شكل رقم (99) جنس *Alternaria* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صـــورة لكونيدات *A. alternata* (وسط)، *A. infectoria* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

5- الجنس *Fusarium*:

يمتلك هذا الجنس كونيدات صغيرة وكونيدات كبيرة على شكل المنجل. والكونيدات الصغيرة تكون وحيدة الخلية، والكونيدات الكبيرة لا تكون غامقة اللون لكنها يمكن أن تكون بيضاء اللون الى وردية مائلة للاحمرار وقد تكون بنية اللون، ويضم هذا الجنس العديد من الأنواع التي يستطيع بعضها إنتاج سموم فطرية خطيرة.

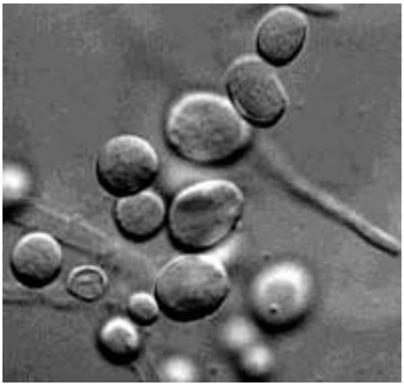
ومن أهم أنواعه ***F. graminearum*** الذي ينمو على نباتات العائلة النجيلية والباذنجانية والبقولية، كما يمكن أن يتواجد على الحبوب المخزنة، ويفرز سموم **Zearalenone** و **Nivalenol**، و ***F. moniliforme*** الذي ينتج سم **Fumonisins**، وكذلك ***F. oxysporum*** الذي ينمو رمياً كما يسبب أمراض للنبات، ويسبب التسمم للحيوانات.

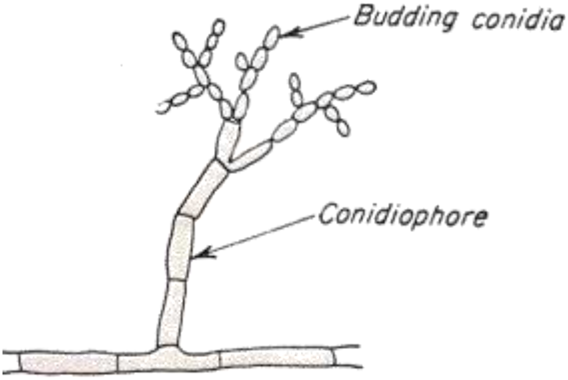


شكل رقم (100) جنس *Fusarium* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صورة للكونيدات الكبيرة منجلية الشكل والكونيدات الصغيرة وحيدة الخلية (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

6- الجنس *Chrysonilia* (*Neurospora*):

يمتلك ميسليوم مقسم، الهيفات Hyphae هوائية تحمل كونيدات بيضاوية الشكل حمراء أو وردية، وقد كان يعرف قديماً باسم *Monilia*، ومن أهم أنواعه *Chrysonilia sitophila* الطور الجنسي له يعرف باسم *Neurospora sitophila* (*Monilia sitophila*) ويعرف هذا النوع بعفن الخبز الأحمر حيث أنه ينمو على الخبز ويكسبه اللون الأحمر .

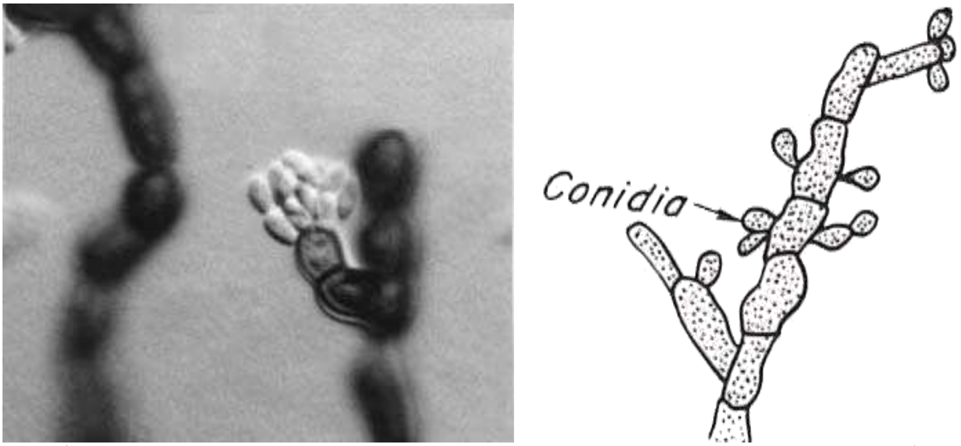




شكل رقم (101) عفن *Chrysonilia sitophila* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صورة لكونيداته بيضاوية الشكل (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

7- الجنس *Aureobasidium*:

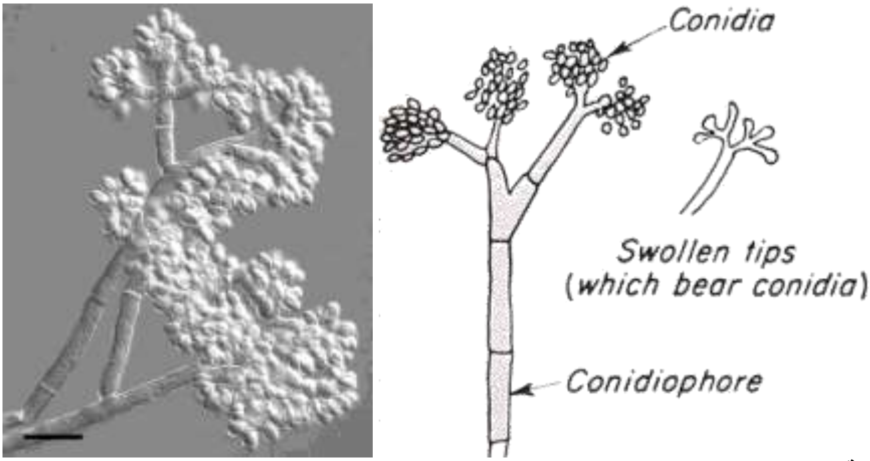
يتميز هذا الجنس بكون كونيداته بيضاوية الشكل وشفافة (على هيئة جراثيم برعمية Blastospore أو براعم من خلايا قديمة) محمولة كبراعم جانبية على كافة أجزاء الميسليوم، وتكون مستعمرات هذا النوع شاحبة ولزجة وشبيهة بالخمائر عندما تكون يافعة وتصبح خيطية داكنة وجلديه بتقدم عمر المستعمرة. والنوع الشائع في هذا الجنس هو *A. pullulans* وهو ينتشر في مدى واسع من الأغذية لكنه نادراً ما يسبب تلف هذه الأغذية.



شكل رقم (102) عفن *A. pullulans* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، صورة لهذا الجنس بكونيداته الشفافة والبيضاوية الشكل (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

8- الجنس *Botrytis*:

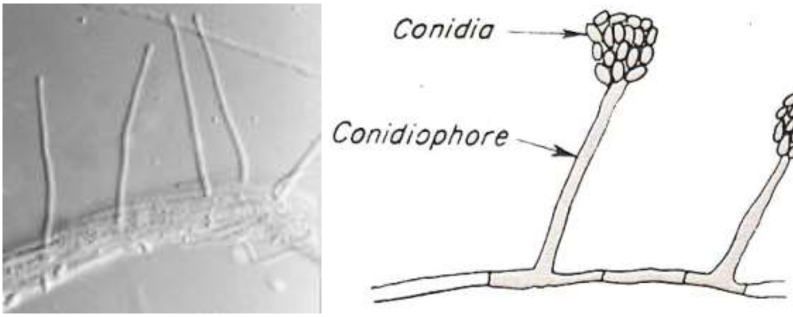
يتميز هذا الجنس بلونه الأسمر ومستعمراته الرمادية، ويكون الميسليوم صوفي المظهر، والحوامل الكونيدية **Conidiophores** طويلة ومنتصبة متفرعة وذات لون بني، الكونيدات وحيدة الخلية جافة، شفافة بنية شاحبة تكون على نتوءات صغيرة، وتحمل الكونيدات في تجمعات (على قمة حامل كونيدي له نهاية منتفخة) على هيئة عناقيد مفككة والحامل الكونيدي يكون متفرع بغير انتظام، وغالباً ما يكون أجساماً حجرية **Sclerotia**. ومن أهم أنواعه ***Botrytis cinerea*** الذي يعيش رمياً أو متطفلاً على عدد كبير من النباتات، كما يسبب التلف للخضروات والفواكه خلال عمليات النقل والتخزين، إضافة إلى النوع ***B. aclada*** الذي يسبب التلف للبصل والثوم خلال التخزين والحفظ.



شكل رقم (103) جنس *Botrytis* (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، الكونيدات على هيئة عناقيد مفككة على حامل متفرع بغير انتظام لعفن *B. cinerea* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

9- الجنس *Acremonium*:

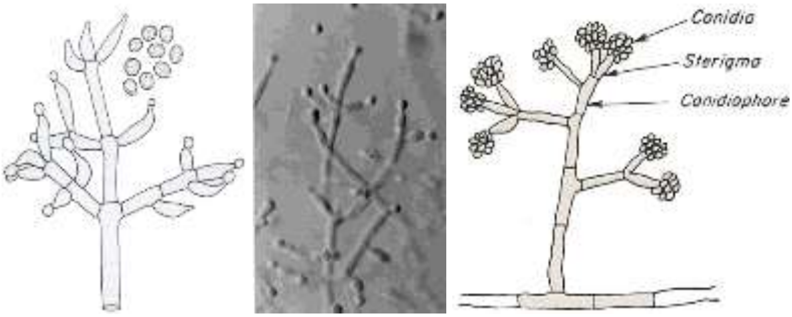
ويعرف هذا الجنس باسم *Cephalosporium*، وهو من الأجناس التي تفرز السموم الفطرية في الغذاء، كما أن بعض أنواعه تنتج مضادات حيوية مثل *Acremonium strictum* (*Cephalosporium acremonium*) الذي ينتج المضاد الحيوي سيفالوسْبورين Cephalosporin والنوع *A. fusidioides* الذي ينتج المضاد الحيوي Fusidic acid. وأهم ما يميز هذا الجنس أن تجمعات الكونيدات فيه تحمل في تجمعات على قمة الحامل الكونيدي وتكون على هيئة عناقيد مفككة وهي ملتصقة سوياً على هيئة كرات والحوامل الكونيدية فيه غير متفرعة.



شكل رقم (104) جنس *Acremonium*، (يمين)، عن (Frazier and Westhoff, 1997)، الحوامل الكونيدية غير المتفرعة فيه (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

10- الجنس *Trichoderma*:

إن أهم ما يميز هذا الجنس من الفطريات الناقصة أن مستعمراته خضراء اللون، وله كونيدات وحيدة الخلية ملتصقة سوياً على هيئة كرات تحمل في تجمعات على الذنيبات Sterigmata في قمة الحامل الكونيدي الذي يكون عديدة التفرع. ويستخدم هذا الجنس في انتاج الكتلة الحيوية باستعمال الكحول المثيلي كمصدر كربوني، في حين تستخدم بعض أنواعه لإنتاج الإنزيمات المحللة للسليلوز مثل *T. reesei*. ويضم انواع منتجة للسموم الفطرية مثل *T. viride* و *T. lignorum* المنتجة لسم Trichodermin و*T. roseum* المنتج لسم Trichothecin.

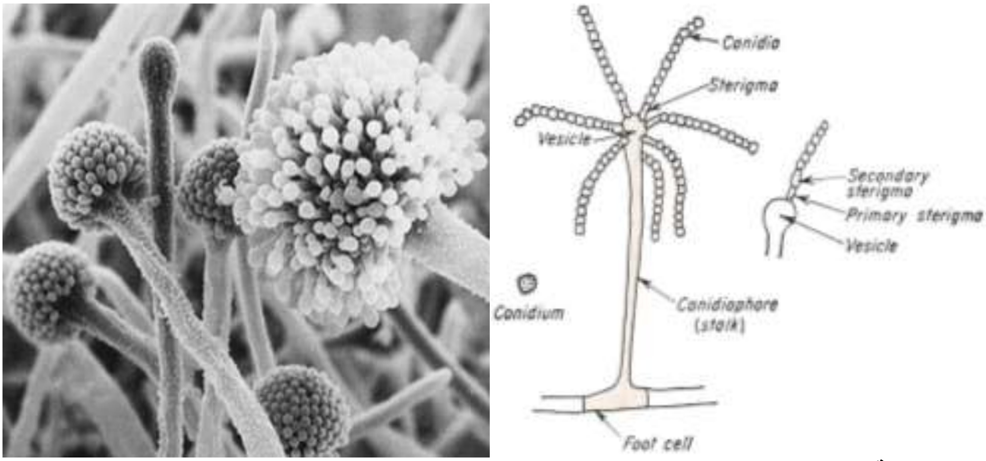


شكل رقم (105) جنس *Trichoderma*، (يمين)، (Frazier and Westhoff, 1997)، *T. harzianum* (وسط)، عن (Pitt and Hocking, 2009)، مع رسم له (يسار)، عن (Samson *et al.*, 1995).

11- الجنس *Aspergillus*:

يمتلك هذا الجنس ميسليوم مقسم عديم اللون. يحمل عدداً من الحوامل الكونيدية **Conidiophores** المنتصبة غير المتفرعة، والحامل الكونيدي في هذا الجنس يبرز من خلية قدمية (**Foot cell**)، ويستدير في طرفه ليشكل الحويصلة (الرأس الكونيدي) **Vesicule** التي ينبثق منها عدد كبير من الزوائد القصيرة او الذنيبات **Sterigmata** وقد توجد طبقة واحدة او عدة طبقات من الذنيبات تنتشر على طول الحويصلة حيث ان اول طبقة تسمى الذنيبات الاولية **Primary sterigmata** والتي تليها تسمى الذنيبات الثانوية **Secondary sterigmata**. الذنيبات بدورها تحمل الكونيدات التي تتحرر منها عندما تنضج.

الكونيدات وحيدة الخلية تكون على هيئة سلسلة من الجراثيم الكونيدية تتعاقب بطريقة قِمية وتنشأ من كافة الأجزاء أو من الجزء العلوي للنهاية المنتفخة (الحويصلة) للحامل الكونيدي، وتكون الكونيدات إما شفافة أو ملونة بالأصفر أو البني أو الأسود أو الأخضر.



شكل رقم (106) جنس *Aspergillus* (يمين)، عن (**Frazier and Westhoff, 1997**)، صورة لـ *Aspergillus oryzae* (يسار)، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

تنتشر أفراد هذا الجنس بشكل كبير في الطبيعة، وبعضها يؤدي إلى إحداث الأمراض عند الإنسان والحيوان والنبات، كما أن بعضها ينتج سموماً فطرية لها تأثير ضار. ويضم هذا الجنس نحو 200 نوعاً موزعة ضمن 18 مجموعة. وتنمو أفراد هذا الجنس بشكل جيد في العديد من المواد الغذائية الحاوية على تراكيز عالية من الملح والسكر.

ومن أهم أنواعه ما يلي:

1- *Aspergillus flavus* الذي ينمو بشكل كبير على المواد العضوية في طور التحلل، وكذلك على المواد الغذائية، خاصةً البذور الزيتية. ويشتهر هذا النوع بإفرازه للسموم الفطرية.

2- *Aspergillus niger* والذي ينتشر بشكل واسع، ويستخدم صناعياً لإنتاج حامض الستريك والجلوكونيك، وكذلك الإنزيمات المحللة للنشا.

3- *Aspergillus candidus* وهذا النوع محب للضغط الاسموزي، ويتواجد على المواد الغذائية قليلة الرطوبة وعلى الحبوب المخزنة، ويعد أحد العوامل المسببة لإرتفاع حرارة الحبوب المخزنة وتعفن الدقيق.

4- *Aspergillus clavatus* يتواجد على المواد النباتية في طور التحلل، وله القدرة على النمو في الأوساط القلوية، وكذلك المواد الغنية بمحتواها من النيتروجين، وعند نموه يرفع الأس الهيدروجيني pH إلى معدلات مرتفعة ($pH = 9.5$). وينتج مادة الكلافاسين السامة.

5- *Aspergillus fumigatus* يتواجد على المواد العضوية الرطبة، ويسبب تحللها السريع مع إنتاج كمية من الحرارة. وينتج بعض المركبات السامة مثل Fumagilline وغيرها.

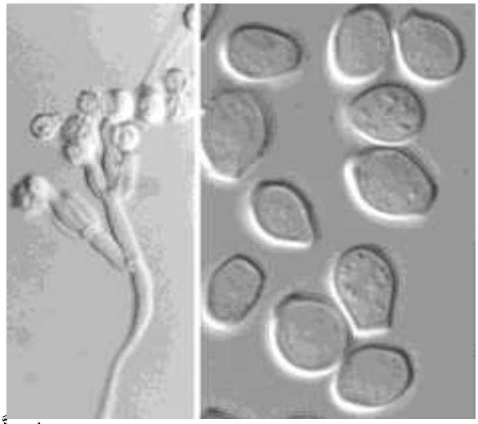
6- *Aspergillus ochraceus* يتواجد على النباتات المتحللة، وقد عزل من الحبوب المتعفنة، وله القدرة على البقاء في أوساط منخفضة الرطوبة وعالية الملوحة. وهذا النوع يفرز سموم فطرية مثل حامض البنسليك Penicillic acid والاوكراتوكسين Ochratoxin.

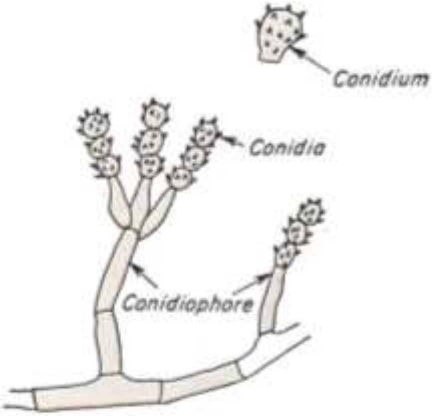
7- *Aspergillus oryzae* يعد وأحد من الفطريات الصناعية وذلك لامتلاكه القابلية على إنتاج العديد من الانزيمات مثل الانزيمات التي تحلل للسليلوز والبروتينات والدهون، كما يستعمل في انتاج صلصة الصويا والعديد من الأغذية المتخمرة الشرقية.

8- *Aspergillus tamarii* عُزل لأول مرة من فول الصويا المتخمر المسمى Tamari وبعد ذلك عُزل من التربة والمواد النباتية في طور التحلل وكذلك من بعض المواد الغذائية كحبوب البن وحبوب الكاكاو والفول السوداني وغيرها، ويمتلك هذا النوع نشاطاً محللاً للدهون.

12- الجنس *Scopulariopsis*:

يمتلك هذا الجنس ميسليوم مقسم عديم اللون، حوامله الكونيدية تحمل أيضاً ذنيبات عليها سلسلة من الكونيدات، لكن أهم ما يميز هذا الجنس عن جنس *Aspergillus* الذي يشترك معه في أن كليهما تكون فيه الكونيدات وحيدة الخلية تقتطع على هيئة سلاسل من الذنيبات، أن الرأس الجرثومي فيه يشبه الفرشاة وهو بذلك يتشابه مع أجناس *Penicillium* و *Paecilomyces*، إلا أنه يختلف عنهما أيضاً في أن ذنيباته مفردة، والحامل كونيدي له متفرع بغير انتظام، والكونيدات الناضجة مبتورة أَو مُسَطَّحة عند قاعدتها. مستعمرات هذا الجنس بيضاء أو صفراء برتقاليّة أَو بنية. والنوع الشائع في هذا الجنس هو *Scopulariopsis brevicaulis* وقد عُزل من العديد من الأغذية كحبوب وطحينِ الأرزّ ومن الحليب المجفف منزوع الدهن ومن الزبد ومن فول الصويا والفلفلِ الأسودِ والفول السوداني والقمح ومن منتجات اللحوم كالسلامي واللانشون وتشير التقارير إلى تسببه في فساد أنواع من الجبن.



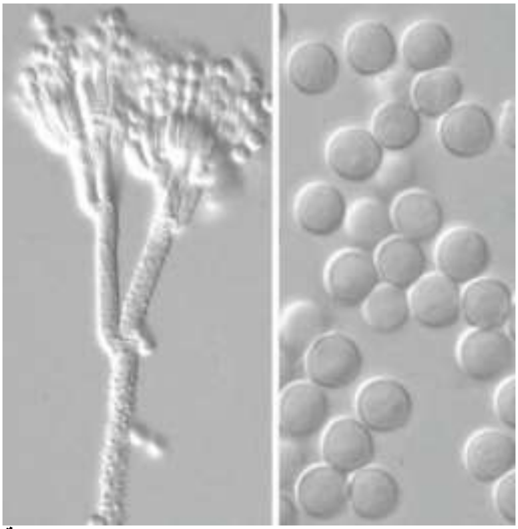


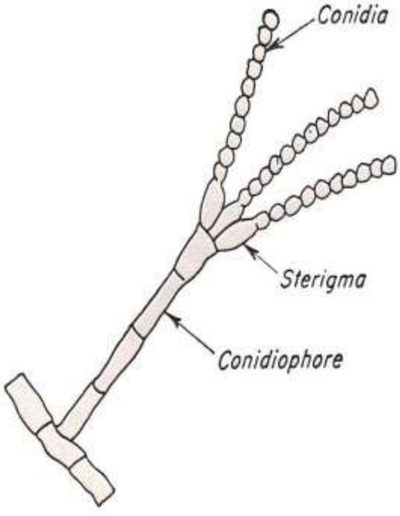
شكل رقم (107) جنس *Scopulariopsis*، (يمين)، (Frazier and Westhoff, 1997)، كونيدات مُسَطَّحة القاعدة (وسط)، الذنيبات والحامل كونيدي لـ *S. brevicaulis* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

13- الجنس *Penicillium*:

يمتلك هذا الجنس أيضاً ميسليوم مقسم عديم اللون، حوامله الكونيدية Conidiophores تحمل ذنيبات تكون في مجموعات ولها رِقابِ قصيرة وهذه الذنيبات بدورها تحمل سلسلة من الكونيدات التي تكون في الغالب خضراء عندما تكون فتية وتصبح مسمرة اللون عندما تكون ناضجة، والكونيدات الناضجة كروية إلى إهليجية (بَيْضَوِيّة) الشكل.

ويقسم أفراد هذا الجنس إلى عدة مجموعات تبعاً لشكل الرؤوس الحاملة للكونيدات وطريقة تفرعها وتماثلها او عدم تماثلها، وهذه الرؤوس يمكن أن تكون متماثلة أو غير متماثلة، بسيطة أو معقدة.





شكل رقم (108) جنس *Penicillium*، (يمين)، (Frazier and Westhoff, 1997)، الكونيدات الكروية (وسط)، الذنيبات والحامل كونيدي لـ *P. roquefortii* (يسار)، عن (Pitt and Hocking, 2009).

ويضم هذا الجنس أكثر من 200 نوع، يكون الكثير منها مسئولاً عن فساد الأغذية، وبالمقابل فإن هناك أنواع منه تستخدم صناعياً في إنتاج الكثير من المواد المهمة. ومن أهم أنواعه ما يلي:

1- ***P. camembertii*** يستخدم في إنضاج جبن الكممبرت **Camembert** وجبن البري **Brie**.

2- ***P. roquefortii*** الذي يستخدم في إنضاج جبن الركوفوت **Roquefort**.

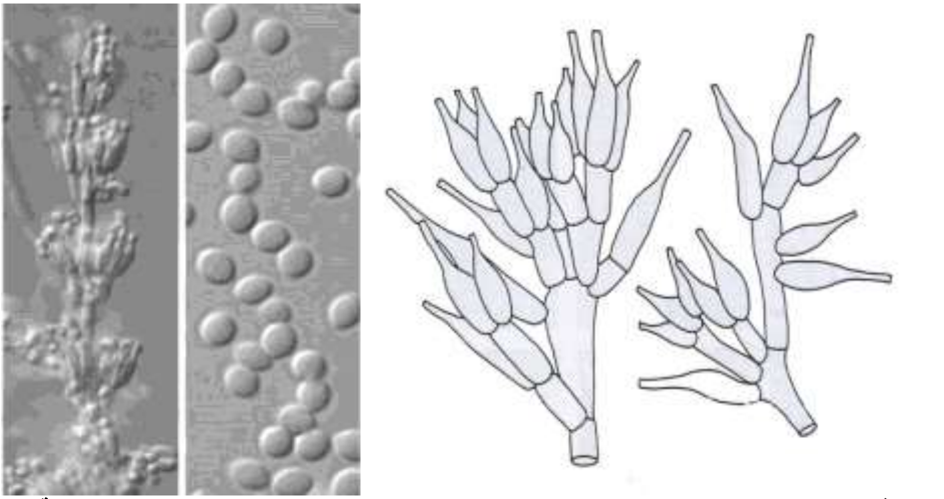
3- ***P. italicum*** و ***P. digitatum*** يتسببان في فساد وتعفن ثمار الحمضيات.

4- ***P. chrysogenum*** يتواجد في التربة والمواد الغذائية والمواد العضوية ويستخدم صناعياً في إنتاج مجموعة المضادات الحيوية المعروفة باسم البنسلين.

14- الجنس *Paecilomyces*:

يمتلك هذا الجنس مقسم ميسليوم أيضاً رأساً جرثومياً يشبه الفرشاة وحوامله الكونيدية تحمل ذنيبات تكون أيضاً في مجموعات كما في جنس ***Penicillium*** إلا أن أهم ما يميزه عن جنس ***Penicillium*** هو أن ذنيباته لها رِقابِ طويلةِ مائلة بعيداً عن محورِ الذنيبة، مُسْتَدقة (متناقصة) بشكل تدريجي، كما أن كونيدياته تكون إهليجية (بَيْضَوِيّة) إلى مغزليِة.

ومن أنواع هذا الجنس الشائع تواجدها في الأغذية المختلفة ***P. variotii*** (من الأعفان المحبة للجفاف **Xerophilic**) والذي لوحظ بأنه مقاوم لتأثير حامض السوربيك **resistance Sorbate** وبالتالي يتسبب في فساد المارجرين والجبن المطبوخ، وكذلك ***P. lilacinus*** الذي تُشير التقارير إلى كونه من الأعفان المفرزة للسموم الفطرية ويفرز سم يدعى **Paecilotoxin**.



شكل رقم (109) جنس ***Paecilomyces*** (يمين)، عن (**Samson *et al*., 1995**)، الكونيدات المغزلية (وسط)، الذنيبات ذات الرِقابِ الطويلة لـ ***P. lilacinus*** (يسار)، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

ثالثاً ـ الأعفان المقسمة التى تتكون جراثيمها داخل أكياس زقية Ascomycetes:

تتميز الفطريات الزقية بتكوين جراثيم جنسية تسمي بالجراثيم الزقية Ascospores وتوجد هذه الجراثيم داخل اكياس تعرف بالأكياس الزقية Asci وهذه الاكياس تتجمع داخل اعضاء تسمى الثمرة الزقية Ascomata وتعرف أيضاً بـ Ascocarps. ومن أهم الأجناس التابعة لهذه المجموعة من الأعفان والمرتبطة بالأغذية أجناس *Monascus* و *Byssochlamys* و *Talaromyces* و *Eupenicillium* و *Emericella* و *Eurotium* و *Neosartorya*.

دليل عام للتعرف على الفطريات الزقية Ascomycetes فى الأغذية:

1 (أ)- الثمرة الزقية معنقة Stalked بوضوح، السُوَيقة (العنق Stalk) تتكون من هيفا Hypha مفردة، والطور اللاجنسي هو *Basipetospora* .... (*Monascus*).

1 (ب)- الثمرة الزقية غير معنقة، والطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو إما *Penicillium* أو *Paecilomyces* أو *Aspergillus* .... (2).

2 (أ)- الثمرة الزقية بدون جدار واضح، والطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو *Paecilomyces* .... (*Byssochlamys*).

2 (ب)- الثمرة الزقية لها جدار، والطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو إما *Penicillium* أو *Aspergillus* .... (3).

3 (أ)- الطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو *Penicillium*، والثمرة الزقية لها غطاء مميز، أصفر وأحياناً يصبح مُحْمَرّ .... (*Talaromyces*).

3 (ب)- الطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو *Penicillium*، والثمرة الزقية كبيرة جدارها ناعم وألوانها زاهية في أغلب الأحيان، تنْضجُ منتجة عدد من الأكياس الزقية ثُمانية الجراثيم .... (*Eupenicillium*).

3 (ج)- الطور اللاجنسي (الكونيدي) Anamorph هو *Aspergillus*، والثمرة الزقية لها خلايا غطائية Hülle cells (أو) واحد إلى بضعة جدر طَبَقَية .... (4).

4 (أ)- الطور اللاجنسي (الكونيدي) مجموعة *Aspergillus nidulans* وجدار الثمرة الزقية محاط بخلايا غطائية (Hülle cells) .... (*Emericella*).

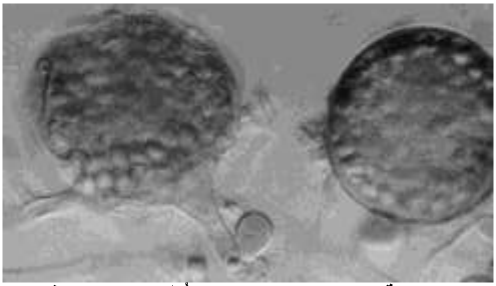
4 (ب)- جدار الثمرة الزقية غير محاط بخلايا غطائية .... (5).

5 (أ)- الطور اللاجنسي مجموعة *Aspergillus glaucus*، والثمرة الزقية صفراء، جدارها يتكون من طبقة واحدة من خلايا مُسَطَّحة .... (*Eurotium*).

5 (ب)- الطور اللاجنسي مجموعة *Aspergillus fumigatus* والثمرة الزقية بيضاء إلى كريمية، جدارها يتكون من عدة طبقات من الخلايا المُسَطَّحة .... (*Neosartorya*).

1- الجنس *Monascus*:

احد الاجناس الأعفان التي تنتج بعض أنواعه السموم الفطرية في الاغذية، لكن هناك أنواع أخرى تستخدم في إنتاج الأغذية المتخمرة (للأغذية الشرقية)، ولمعظم افراد الجنس المستعملة في تخمرات الاغذية القابلية على انتاج الانزيمات التي تحلل البروتينات والتي تحلل النشا كما أن بعض أنواعه تنتج صبغات منها الصبغة الصفراء **monascin** المنتجة من قبل ***M. purpureus*** المستعمل في انتاج الاغذية المتخمرة، كما أن النوع ***M. ruber*** يستعمل في انتاج الصبغة الحمراء **monascorbrin** لذلك يستعمل في انتاج الكوجي الاحمر **red koji** (الرز الاحمر أو ما يعرف بـ **Ang kak**)، وهناك تقارير عن إنتاج كلا النوعين من العفن لسم السترينين **Citrinin**.



شكل رقم (110) صورة ميكروسكوبية لجنس *Monascus* تُظهر بوضوح ثمرة زقية مغلفة، معنقة بسُوَيقة تتكون من هيفا مفردة، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

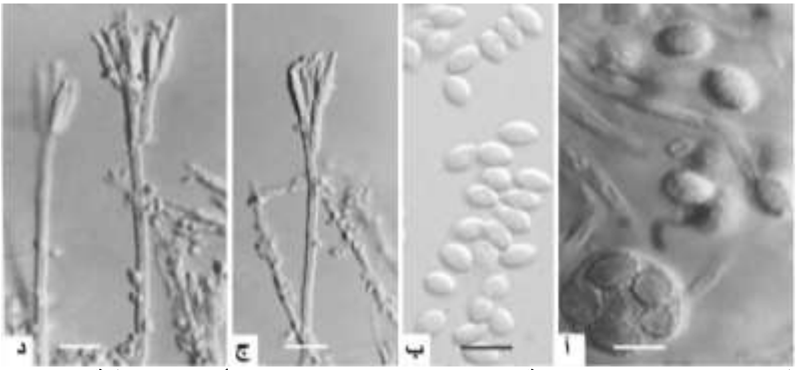
2- الجنس *Byssochlamys*:

ينتج هذا العفن جراثيم زقية **Ascospores** كيسها الزقي ليس له جدار واضح كسابقه، وهذه الجراثيم الزقية تقاوم درجات الحرارة العالية كما ينتج أجسام حجرية **Sclerotia**، كما أنه يفرز إنزيمات محللة للبكتين **Pectinases**، ولذلك فهو يُشكل مشكلة لصناعة المعلبات الغذائية وخصوصاً عصير الفواكه والفواكه المعلبة، (لاحظ الشكل رقم 70 الذي يوضح طريقة الكشف عن وجود جراثيم الأعفان المقاومة للحرارة، الطور اللاجنسي لهذا الجنس هو ***Paecilomyces***، ومن الأنواع المعروفة لهذا الجنس في الأغذية المعلبة كل من ***B .fulva*** و ***B. nivea***.

شكل رقم (111) صور ميكروسكوبية لعفن *Byssochlamys fulva*، (أ) الكيس الزقي بدون جدار واضح، (ب) الكونيديات، (ج، د) الطور الكونيدي *Paecilomyces*، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

3- الجنس *Talaromyces*:

أسم هذا العفن مُشتَق مِن كلمةٍ يونانية تعني سلة، وهي وصف ملائم للجسم الذي ينتج فيه الأكياس الزقية لهذا الجنس. والثمرة الزقية في هذا الجنس لها غطاء مميز، أصفر وأحياناً يصبح مُحْمَرّ، والطور اللاجنسي (الكونيدي) **Anamorph** له هو *Penicillium*، ولهذا الجنس حوالي 25 نوع من أهمها الأنواع المقاومة للحرارة **Heat-resistant**، فهو كسابقه ينتج جراثيم زقية **Ascospores** تقاوم درجات الحرارة العالية، وقد عزل من عصائرِ الفاكهةِ المُبَستَرةِ ومُنتَجاتِ الفاكهةَ المعلبة. ومن أنواعه المقاومة للحرارة *T. macrosporus* و *T. trachyspermus* لكن من أكثر أنواعه انتشاراً *T. flavus* وقد عزل من بعض المنتجات الغذائية كالحُبوب.

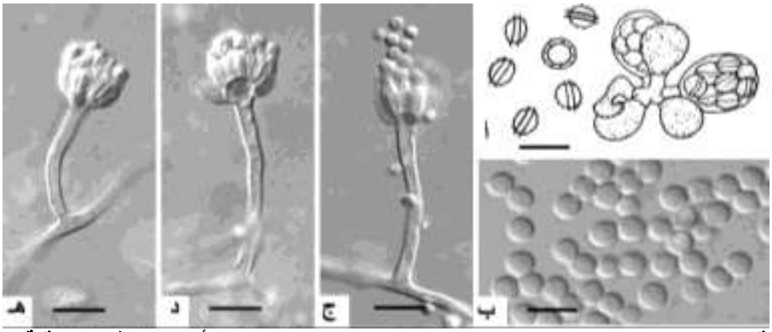


شكل رقم (112) صور ميكروسكوبية لعفن *Talaromyces flavus* (أ) الثمرة الزقية لها غطاء مميز، (ب) الكونيديات، (ج، د) الطور الكونيدي *Penicillium*، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

4- الجنس *Eupenicillium*:

يتميز هذا الجنس بأن ثمرته الزقية كبيرة (قطرها يتراوح بين 100 إلى 500 ميكروميتر) لها جدار ناعم ألوانها زاهية في أغلب الأحيان، والطور اللاجنسي (الكونيدي) **Anamorph** له هو ايضاً *Penicillium*، وفي العديد من أنواعه تصبح الثمرة الزقية صلبة مع الوقت وهذا يستغرق أسابيع أو أشهر، وفي الأخير تنْضجُ مِنْ المركزِ منتجة العديد من الأكياس الزقية ثُمانية الجراثيم، ونتيجة لهذا التأخير يكون تصنيف هذا الجنس من الأمور الصعبة نوعاً ما إذا كان على أساس الصفات المظهرية للجراثيم الزقية.

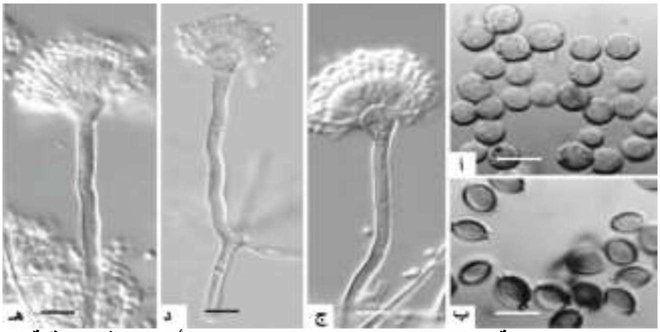
أن معظم أنواع هذا الجنس من فطريات التربة ولذلك لم تلقى اهتمام من المتخصصين في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية على الرغم من ظهوره من وقت لآخر في الأغذية المعاملة حرارياً نتيجة لتحمله لتلك المعاملات، وذلك بسبب الثمار زقية غير الناضجة التي تعد أجساماً حجرية **Sclerotia**، إضافة إلى أن معظم أنواعه تُكون جراثيم زقية مقاومة للحرارة **Heat-resistant Ascospores**، وقد عزل من عصائرِ الفاكهة، لكن من حسن الحظ فإن تلوث الأغذية المعاملة حرارياً به قليل. ومن أنواعه المعروفة *E. cinnamopurpureum*، الذي يتواجد في الدقيق.



شكل رقم (113) عفن ***Eupenicillium cinnamopurpureum*** (أ) شكل الثمرة الزقية الكبيرة، (ب) الكونيديات، (ج، د، هـ) الطور الكونيدي ***Penicillium***، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

5- الجنس *Emericella*:

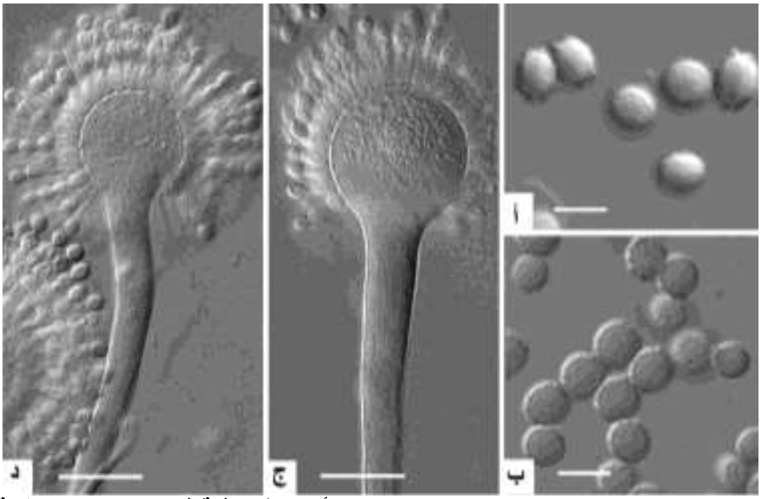
يتميز هذا الجنس بأن جدار الثمرة الزقية محاط بخلايا غطائية (**Hülle cells**) والطور اللاجنسي (الكونيدي) مجموعة ***Aspergillus nidulans***، ويكون جراثيم زقية تتراوح الوانها من الاحمر الفاتح الى البنفسجي الفاتح اما التكاثر غير الجنسي فيتم بتكوين الكونيديات، وقد عرف عن هذا الجنس إفرازه لبعض السموم مثل سم الستريجماتوسستين **Sterigmatocystin** الذي يتسبب في حدوث تلف حاد في الكلى والكبد والمعروف بأنه مسرطن للكبد، ومن أشهر أنواعه ***Emericella nidulans*** ويتواجد في العديد من الأغذية ويفرز سم ستريجماتوسستين.



شكل رقم (114) صور ميكروسكوبية لعفن ***Emericella nidulans***، (أ) الجراثيم الزقية محاط بخلايا غطائية، (ب) الكونيديات، (ج، د، هـ) الطور الكونيدي ***Aspergillus***، عن (**Pitt and Hocking, 2009**).

6- الجنس *Eurotium*:

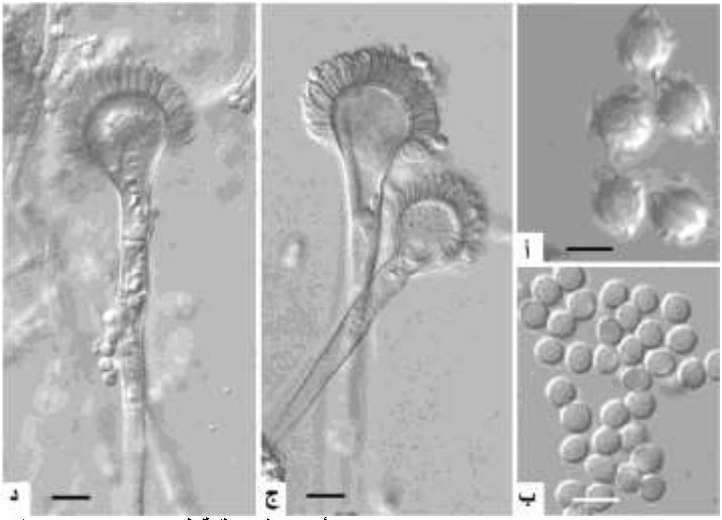
هذا الجنس من الأعفان المحبة للجفاف **Xerophilic molds**، ويتميز بأن ثمرته الزقية صفراء اللون، جدارها يتكون من طبقة واحدة من خلايا مُسَطَّحة، وطوره اللاجنسي مجموعة ***Aspergillus glaucus***. ويعد من اهم الأعفان التي تتسبب في فساد الحبوب المُخزنة، كما أن من أنواعه ما يفرز سموم فطرية و مواد قلويدية مثل **Neoechinulins** و **Echinulins** ومن هذه الأنواع ***E. amstelodami*** و ***E. chevalieri***. أما من أنواع هذا الجنس التي تدخل في إنتاج الاغذية الشرقية المتخمرة كل من ***E. repens*** و ***E. rubrum***.



شكل رقم (115) صور لعفن *Eurotium amstelodami* (أ) جراثيم زقية ذات جدار وحيد الطبقة من الخلايا المُسَطَّحة، (ب) الكونيديات، (ج، د) الطور الكونيدي *Aspergillus*، عن (Pitt and Hocking, 2009).

7- الجنس *Neosartorya*:

ينتج هذا الجنس ثمرة زقية تختلف عن تلك التي ينجها جنس *Eurotium* من حيث اللون فثمرته الزقية بيضاء إلى كريمية وليست صفراء، كما أن جدارها يتكون من عدة طبقات من الخلايا المُسَطَّحة، كما يختلف عن جنس *Eurotium* في كونه ليس من الأعفان المحبة للجفاف Xerophilic molds، وأنواعه الأثنى عشر جميعها إما من الأنواع المحبة أو المتحملة للحرارة. والطور اللاجنسي له مجموعة *Aspergillus fumigatus*، ومن اهم أنواعه في مجال الأغذية *Neosartorya fischeri*



شكل رقم (116) صور لعفن *Neosartorya fischeri*، (أ) جراثيم زقية ذات جدار متعدد الطبقات من الخلايا المُسَطَّحة، (ب) الكونيديات، (ج، د) الطور الكونيدي *Aspergillus*، عن (Pitt and Hocking, 2009).

السموم الفطرية Mycotoxins:

تفرز بعض الأعفان عددًا من المواد الكيميائية السامة تعرف بالسموم الفطرية وقد أُشتق اسم السموم الفطرية Mycotoxins من مقطعين يونانيين هما Mykes ويعني فطر و Toxikon ويعني سم. وتعرف السموم الفطرية على أنها نواتج تمثيل ثانوي ناتجة من نشاط بعض السلالات لفطريات معينة على المواد الغذائية، ولهذه النواتج أثار ضارة على صحة الإنسان والحيوان. وقد تعرض الإنسان على مر العصور إلى الكثير من الكوارث التي أدت إلى حدوث اضطرابات اجتماعية خطيرة في العديد منه مناطق العالم مثل المجاعات، موت أعداد هائلة من السكان والهجرة فضلاً عن هلاك الآلاف من الحيوانات الزراعية، وكان السبب وراء العديد من هذه الكوارث هو حدوث الإصابة بالفطريات وإفراز سمومها في العديد من المحاصيل الزراعية، ولكن نظراً لعدم تطور الأجهزة المختبرية وتقنيات الكشف عن السموم الفطرية في تلك العصور لم يدرك الباحثون والمهتمون بدراسة مسببات هذه الكوارث أن السموم الفطرية التي كانت تفرزها الفطريات عند غزوها لمختلف مصادر الغذاء، كانت وراء موت أعداد هائلة من السكان وهلاك الآلف من الحيوانات الزراعية.

وقد وردت أول الإشارات عن هذه السموم في بعض التقارير المتاحة منذ القرن السابع عشر الميلادي عن حالات التَّسَمُّمُ بالأَرْغوت Ergotism الناجمة عن التغذية على غذاء الشعير الملوث بفطر *Claviceps purpurea*، وشكلت هذه التقارير البداية الفعلية للتنبيه إلى أهمية دور السموم الفطرية. وتشير المصادر إلى العديد من التقارير التي تخوض في هذا المجال منها تقرير كوخل عام 1910م والذي أُعتبر بمثابة الإنذار المبكر عن مشكلة السموم الفطرية، وبعد خمسون عام من هذا التقرير أي في عام 1960م ظهر التقرير المشهور والمعروف عن المرض الوبائي الذي أدى إلى هلاك 100000 من الديوك الرومية في إنجلترا والذي سمي حينها Turkey X Disease وكلا التقريرين أشارا إلى مسئولية الفول السوداني المصاب بعفن *Aspergillus flavus* عن حالات الإصابة الوبائية. بينما كانت البداية في تعريف السم الفطري الناتج Aflatoxin نتيجة جهود العالم أساوا وزملائه عام 1963م.

وقد تبين من خلال الدراسات والبحوث المستفيضة التي تلت هذا الاكتشاف أن هناك عدداً كبيراً من الفطريات من مختلف الأجناس لها القدرة على إنتاج السموم الفطرية حيث توصل العلماء خلال العقود الماضية من القرن الحالي إلى الكشف عن مئات المركبات السمية التي تنتجها مختلف السلالات من أنواع مختلفة من الفطريات، ولقد تم توصيف هذه المركبات بشكل دقيق، ودرست تأثيراتها في شتى الكائنات الحية، سواء تحت ظروف المخبر أو على النطاق الميداني التطبيقي، وفي ضوء ما تم اكتشافه من خواص هذه المركبات تم تصنيفها تبعاً لنوع الفطر المنتج لها وخواصها الفيزيائية وتركيبها الكيميائي.

ويمكن للسموم الفطرية أن تلوث الأغذية أو المواد الأولية المستخدمة في صناعة الأعلاف الحيوانية التي سبق وأن حصل فيها نمو للفطريات المنتجة لهذه السموم في مرحلة ما تقع ما بين إنتاج المحصول الزراعي في الحقل إلى حين وصوله إلى المستهلك. وفى العادة هناك علاقة مباشرة ما بين وجود السم الفطري أو مجموعة السموم الفطرية في مصادر الغذاء وحدوث الإصابات الفطرية سواء في الغذاء أو المواد الأولية المستخدمة في تصنيعه. وبالرغم من أن الفطر قد لا يكون موجوداً بعد التصنيع والخزن ولكن غالباً ما يبقى السم الفطري الذي أنتجه ذلك الفطر موجوداً في الغذاء. وهناك العديد من الحالات التي يحدث فيها مرور السموم الفطرية عبر سلسلة الغذاء وظهورها في بعض السلع الغذائية، مثل الحليب على الرغم من أن هذه المادة لم يحدث فيها سابقاً أي نمو فطري.

إن إنتاج السموم الفطرية ليس مقصوراً على مجموعة واحدة من الأعفان بغض النظر عن التصنيف التركيبي أو التوزيع البيئي أو الجنس، حيث تنتج هذه المركبات من مجموعة متباينة من الأجناس وتحت ظروف مناسبة من الحرارة والرطوبة النسبية وفي مختلف الأوساط الغذائية. وبالرغم من وجود عدد كبير من الفطريات من مختلف الأنواع الأجناس التي دورها إنتاج المركبات السمية، إلا أن الفطريات من أجناس *Aspergillus*، *Penicillium* و*Fusarium* تعد الأكثر أهمية من بينها وهناك عدد من الأنواع تنتمي إلى كل جنس من الأجناس الثلاثة أنفه الذكر.

ولكن ينبغي التأكيد على أن وجود الأعفان التي لها القدرة على إنتاج المركبات السمية على المواد الغذائية والمواد العلفية الأولية لا يعني بالضرورة أن مثل هذه المواد تكون دائماً ملوثة بالسموم الفطرية، حيث أن هناك العديد من العوامل البيئية التي تتحكم في قدرة العفن على إنتاج السموم الفطرية، فضلا عن ذلك فإن مدى سمية العديد من المركبات الأيضية الثانوية التي تنتج من قبل مجموعة واسعة من أجناس مختلفة الفطريات التي يمكن أن تحدث في شتى أنواع الغذاء البشري والمواد العلفية الأولية لم يتم تحديدها بعد.

وتتصف السموم الفطرية بأنها مجموعة من المركبات ذات التنوع الواسع من التراكيب الكيميائية، كذلك فلها مدى واسع من التأثيرات السلبية في الفعاليات الحيوية في جسم الكائن الحي لعل أهمها: أحدث السرطانات، تلف الجهاز الكلوي، تسمم الأوعية الدموية، تلف الكبد وغيرها من التأثيرات الضارة الأخرى. ومن الجدير بالذكر أن بعض السموم الفطرية مثل الأفلاتوكسينات تحتاج إلى تنشيطها داخل الجسم من خلال سلسله من التفاعلات الكيميائية كي تبدأ تأثيرها السمي الضار، بينما هناك البعض الآخر من هذه المركبات السمية يكون باستطاعتها أحداث تأثيرها السمي الضار فور دخولها الجسم بدون الحاجة إلى تنشيطها مسبقاً مثل مجموعة الترايكوثيسنات.

أنواع السموم الفطرية و طرق تمييزها وتقديرها:

تشترك السموم الفطرية عموماً عند وجودها في الغذاء في تسببها للعديد من الأمراض و الاضطرابات الفسلجية والحيوية التي تحدث في الإنسان والحيوانات الزراعية من الثديات والدواجن جراء تناول مثل هذه الأغذية الملوثة. وقد تم إلى يومنا هذا تشخيص أكثر من 300 نوع من هذه السموم ذات التراكيب الكيميائية والصفات الفيزيائية المختلفة عن بعضها البعض الآخر. وقد سبب هذا التباين الواسع في هذه الصفات اختلافا واضحاً في كيفية تأثير هذه السموم في مختلف الفعاليات الحيوية للكائنات الحية. وفي ضوء ذلك فانه لا يمكن اعتماد طريقة تحليل موحدة لتشخيص مختلف السموم الفطرية وتقديرها كميا، وحتى لتقدير السم الفطري الواحد، الذي يمكن أن يحدث غفي عدة أصناف من المواد الغذائية، نظراً لاختلاف التركيب الكيميائي والصفات الفيزيائية من مادة غذائية لأخرى، مما يؤثر في السلوك العام للسم الفطري داخلها وكذلك في متطلبات استخلاص المركبات السمية الفطرية من المواد الغذائية.

ومن أهم أنواع السموم الفطرية وأكثرها انتشاراً سموم الأفلاتوكسينات Aflatoxins التي تنتج بواسطة *Aspergillus flavus* و *A. parasiticus* وكذلك عدد من الأنواع الأخرى بضمنها *A. nomius*، وقد اشتق اسم هذا النوع من السموم الفطرية من الحرف الأول من أسم الجنس *Aspergillus* تليه الثلاثة أحرف الأولى من اسم النوع *flavus* (الذي اكتشف مسئوليته عن افراز السم في حادثة هلاك من الديوك الرومية المشار إليها سابقاً) مع إضافة كلمة سم Toxin لتصبح A-fla-toxin. وهناك مجموعتين رئيسيتين من الأفلاتوكسينات هما B و G وقد اكتسبت هذه التسمية نتيجة أن الأفلاتوكسين B يعطي وميض أزرق Blue والأفلاتوكسين G يعطي وميض أخضر Green عند الكشف عنهما بواسطة الأشعة فوق البنفسجية.

وقد تم إلى الآن تم اكتشاف 18 نوع من الأفلاتوكسينات منها الأربعة الانواع الرئيسة الأفلاتوكسينات B_1، B_2، G_1 و G_2، إضافة إلى أفلاتوكسينات M_1 و M_2 الناتجة عن تناول الحيوانات الثدية سموم أفلاتوكسينات B و G عن طريق الأعلاف الملوثة فتتحول في أجسامها إلى أفلاتوكسينات M التي تفرز عن طريق البول والحليب وبالتالي فإن تواجد هذه السموم في منتجات الألبان وخلطات الرُضع تشكل خطورة عالية على الأطفال الرُضع. وتشير نتائج التحليل الكيميائي الحيوي للعزلات المتحصل عليها من نوعي العفن أنفي الذكر إلى أن *A. parasiticus* يقوم بإنتاج الأفلاتوكسينات B_1، B_2، G_1 و G_2؛ أما *A. flavus* فيقوم بإنتاج الأفلاتوكسينات من نوعى B_1 و B_2 فقط.

ويعتبر سمم أفلاتوكسين B_1 من أشد المواد المسببة للسرطان للعديد من الحيوانات وأكثر أعضاء الجسم تأثير هو الكبد، وقد أشارت التجارب إلى أن كمية لا تتعدى 15 ميكروجرام/كجم من وزن الجسم تسبب سرطان الكبد لفئران التجارب. ولذلك فالأفلاتوكسينات تعتبر من السموم كبدية التأثير Hepatotoxin.

ومن السموم الفطرية الأخرى سم أُوكْراتُوكْسين Ochratoxin الذي يفرزه *Aspergillus ochraceus* والذي اكتسب اسمه من اسم النوع لهذا الفطر الذي عُزل منه لأول مرة عام 1965م. كما يفرز هذا السم من أنواع مثل *A. carbonarius* الذي يعتبر أكبر أنواع جنس *Aspergillus* افرازاً لسم الأُوكْراتُوكْسين أ Ochratoxin A، يليه *A. westerdijkiae* وهذين النوعين ينتجان كميات من سم Ochratoxin اكبر من *A. ochraceus* كذلك هناك أنواع أخـــــرى مثل *A. steynii* و *A. melleus* و *A. ostianus* و *A. scierotioum* و *A. sulphureus* و *A. cyclopium* تعد من الأنواع المنتجة لسم Ochratoxin، وهناك أيضاً بعض الأنواع التابعة لجنس البنيسيليوم *Penicillium* ومن أكثرها أنتاج لسم Ochratoxin *A. verrucosum* إضافة إلى أنواع من هذا الجنس مثل *P. nordicum* و *P. commune* و *P. cyclopium* و *A. viridicatum* وغيرها.

والجرعة السامة من الأُوكْراتُوكْسين هي 20 – 22 ملجم/كجم من وزن الجسم لفئران التجارب وأهم الأعضاء عرضة هي الكبد والكلى فهو من السموم كبدية التأثير Hepatotoxin والسموم كُلوية التأثير Nephrotoxin حيث يسبب تهتكا للكُلى كما يسبب فشل كُلوي والتهابات مزمنة وأورام في القناة البولية، كما يلاحظ أيضا بطئ في نمو الحيوانات وتأخر في النضج الجنسي وقلة عدد البيض للطيور عند تناولها لعلائق ملوثة بسم الأُوكْراتُوكْسين.

وهناك أيضاً سم الباتولين Patulin الذي تنتجه أنواع عديدة من جنس *Penicillium* مثل *P. patulum*، *P. expansum*، *P.claviforme* و *p. urticae* وجنس *Aspergillus* مثل *A. clavatus* و *A. terreus*. ومن أهم أعراض التسمم بالباتولين احتقان ونزف الرئة والكلى والكبد والطحال.

ومن السموم الأخرى سم السترينين Citrinin المفرز من *Penicillium cirrinum* و *P. viridicatum* و *P. Expansum* وأنواع من جنس *Aspergillus* مثل *A. terreus* وكذلك *A. candidus* وغيرها، إضافة إلى *Byssochlamys fulva* و *B. nivea* و *Eupenicillium javanicum*. ويعتبر السترينين من السموم كُلوية التأثير Nephrotoxin.

أما عن السموم التي تفرزها أنواع الجنس *Fusarium* فمن أهمها سم الزيرالينون Zearalenone الذي يفرز من أنواع *F. roseum* و *F. moniliforme* و *F. tricinum*.

في حين أن سموم الترايكوثيسينات Trichothecenes ومن أشهر أنواعها T-2 toxin تفرز من أجناس *Fusarium* و *Trichothecium* و *Cephalosporium* و *Trichoderma* و *Stachybotrys*.

وهناك أيضاً سموم فطرية أخرى مثل حامض سايكلوبيازونيك **Cyclopiazonic Acid** الذي يفرز من عدد من الأنواع التابعة لجنسي ***Aspergillus*** و ***Penicillium***، وحامض البنيسيلك **Penicillic acid** والروبراتوكسين **Rubratoxin** المنتجة بواسطة أنواع من جنس ***Penicillium*** وسموم المونيليفورمين **Moniliformin** والفيومونيزين **Fumonisins** المنتجة بواسطة أنواع من جنس ***Fusarium***، وكذلك التَّسَمُّمُ بالأَرْغوت **Ergotism** المُشار إليه سابقاً نتيجة تلوث الحبوب بعفن ***Claviceps purpurea***، وغيرها الكثير فلا يتسع الحديث هنا عن جميع أنواع السموم الفطرية ولذلك فقد تم الاقتصار على أكثرها انتشاراً وشهرة، ويمكن للطالب الراغب في التوسع في معلوماته عن السموم الفطرية العودة إلى بعض المراجع المتخصصة في هذا المجال.

البرنامج العام لتقدير مستويات السموم الفطرية:

في ضوء تراكم المعلومات عن خطورة السموم الفطرية وتأثيرها في الفعاليات الحيوية لمختلف الكائنات الحية، فقد سعى المختصون إلى أيجاد الطرق المناسبة للتقدير الكمي لهذه السموم في مختلف السلع الغذائية. ونظرا لوجود تباين واسع في تراكيب مختلف السموم الفطرية لذا فقد اقتضت الضرورة استنباط مختلف الطرق التحليلية لتقديرها كميا، من جهة أخرى، يجب أن لا يغيب عن الذهن أن طريقة التقدير تتأثر بنوع المادة الغذائية المراد فحصها من حيث المذيبات المستخدمة وكيفية استخلاص السم الفطري منها، الأفلاتوكسينات، على سبيل لا الحصر، يمكن أن تفرز في الحبوب، والفول السوداني ومنتجاته الغذائية الأخرى، الحليب والمنتجات الحيوانية الأخرى، وبالرغم من أن نفس السم يفرز في أصناف الغذاء أنفة الذكر، إلا أن لكل مادة غذائية هناك طريقة استخلاص مختلفة من حيث نوعية المواد الكيماوية المستخدمة وتراكيزها، وبالرغم من التباين الموجود في طرق التحليل الكيميائي للسموم الفطرية غير أن جميعها تشترك في خطواتها العامة عليه يمكن القول بأن طريق التحليل المستخدمة تعتمد الإجراءات العامة التالية:

1- أخذ العينة
2- الاستخلاص
3- تنقية وتنظيف المستخلص
4- تركيز المستخلص
5- فصل وعزل مكونات المستخلص
6- الكشف والتقدير
7- تحديد نوعية السموم كل على حدة.

ولكن تختلف هذه البرامج في طريقة تنفيذ كل خطوة من الخطوات أنفة الذكر من ناحية نوع المذيبات المستخدمة أو طريقة إضافتها والكمية المطلوبة منها، حيث يتوقف ذلك على نوع السم الفطري المراد الكشف عنه وصفات المادة الغذائية الموجودة فيها.

وسائل السيطرة على إنتاج السموم الفطرية:

إن المنفذ الرئيسي للسموم الفطرية إلى سلسلة الغذاء البشري والأعلاف الحيوانية هو من خلال المنتجات الزراعية مثل الحبوب والبذور الزيتية والمنتجات المشتقة من المصدرين أنفي الذكر التي سبق تلوثها بمثل هذه المركبات السمية. ومن وجهة النظر العملية فإن أفضل وسيلة للحد من التلوث بالسموم الفطرية هي منع تكوينها أساساً وعلى الأخص من خلال استبعاد أو الحد من نمو الأعفان المنتجة لهذه المركبات السامة في المواد الأولية الخام أو المصنعة على حد سواء. إن منع تكوين السموم الفطرية يمكن تحقيقه من خلال الآتي:

1- الحد من الإصابات الفطرية خلال فترة نمو المحصل الزراعية.
2- القيام بعملية التجفيف السريع بعد الحصاد.
3- تأمين ظروف الخزن الملائمة للمحاصيل بعد الحصاد.
4- استخدام المواد المضادة لنمو الفطريات.

وعند الشك بوجود تلوث في المواد الأولية أو التوصل إلى تشخيص وجود مثل هذا التلوث في جزء من مخزون المحاصيل الزراعية فإنه يمكن إنقاذ المتبقي منها من خلال اللجوء إلى استخدام تقنيات الفصل الميكانيكي ، فصل السموم بواسطة الطرق الكيميائية المتوفرة (إذا كانت مناسبة من حيث الكلفة والجهد المبذول) أو إزالة السموم وإبطال مفعولها باستخدام التقنيات الفيزيائية، الكيميائية أو الحيوية المتوفرة ويعتمد اختيار الطريقة المناسبة على العديد من العوامل لعل أهمها:

1- نوعية المواد الأولية الملوثة.
2- نوع المواد الكيميائية التي يكون من المناسب استخدامها.
3- تأثير الطريقة المستخدمة في القيمة الغذائية للمواد التي سوف يتم معاملتها.
4- مدى تأثير المواد الكيميائية المستخدمة في صحة المستهلك لاحقاً سواء كان ذلك بالنسبة للغذاء البشري أو العلف الحيواني.
5- كمية السم التي يمكن أزالتها باستخدام أي من التقنيات أنفة الذكر.
6- الجدوى الاقتصادية لمثل هذه العمليات.

الفطريات المأكولة Edible Fungi:

قبل أن يتم اختتام الحديث عن الفطريات ذات الأهمية في الأغذية والانتقال إلى مجموعة أخرى من مجاميع الأحياء المجهرية الأخرى ذات الأهمية في الأغذية، لابد من الحديث عن الفطريات المأكولة Edible Fungi، ومن أكثرها شهرة عَيْشُ الغُرَاب والذي يُعرف أيضاً بالعرهون أو المشروم Mushrooms وهي من الفطريات البازيدية Basidiomycetes، وكثير من أنواعه صالحة للأكل وذات مذاق جيد مثل جنس *Agaricus* لكن بعضها الآخر رديء الطعم، ومنها ما هو سام وهناك من هذه الأنواع السامة ما يمكن أن يكون مميتا عند أكله مثل جنس *Amanita* الذي يضم حوالى 30 نوع بعضها شديد السمية مثل *Amanita phalloides* الذي يفرز سموم محللة لخلايا الجسم وهي عبارة عن ببتيدات حلقية ذات تأثير سام تدعى أماتوكسينات Amatixins ومنها مركبي الفا وبيتا أمانيتين α-amanitin و β-amanitin اللذان يتميزان بثباتهما الحراري وبذلك يستمر تأثيرهما السام حتى بعد طهي الفطر السام. وتتمثل أعراض التسمم بسموم الأماتوكسينات بظهور اضطرابات معوية (مغص وآلام البطن، وغثيان، وقيء، وإسهال)، وتستمر هذه الأعراض خلال اليوم التالي وفي اليوم الثالث يصاب الكبد بتليف شديد وينتهي الأمر عادةً بالوفاة. أما أنواع *A. vaginata* و *A. rubescens* تفرز سموم محللة لكريات الدم تدعى فالُّويدين Phalloidine. في حين أن *A. muscaria* المسمى بفطر عيش الذبابة فتفرز مركبات الموسكيمول Muscimol، وحامض الإيبوتنيك Ibotenic acid، والموسكازون Muscazone التي يتشابه تأثيرها مع تأثير المشروبات الكحولية حيث تؤدي إلى الميل للنوم (النعاس) وقد تصل في تأثيراتها الشديدة إلى الغيبوبة وفقدان الوعي. كما أن هذا الفطر (*A. muscaria*) وفطر *A. pantherina* وأنواع أخرى تابعة لأجناس *Inocybe spp.* وفطر *Clitocybe dealbata* تحتوي على المركب السام مُسْكارِين Muscarine الذي يؤدي إلى زيادة نشاط الغدة الدرقية وزيادة العرق خلال ساعتين من تناول الفطر السام مع حدوث اسهال وغثيان، وقد تصاحب بحالات من الرؤية غير الواضحة والهلوسة.

ومن الفطريات السامة الأخرى فطر *Cortinatius speciosissimus* الذي يكون سموم الأوريلانين Orellanin وهي أيضاً مركبات سامة (تتميز أيضاً بثباتها الحراري) تؤثر على الجهاز الهضمي وتظهر أعراضها على هيئة تشنجات عضلية مصحوبة بصداع وآلام في الظهر، وتتطور الأعراض إلى أن تتسبب في فشل كلوي خلال فترة 7 – 17 يوم من تناول الفطر السام.

أما أنواع عيش الغراب الماكولة التابعة لجنس *Coprinus* فبعضها تفرز سم يدعى كوبرين Coprine الذي تتميز أعراضه السمية بوجود طعم معدني في فم الأنسان يصاحبه احمرار الوجه والرقبة وآلام الصدر مع الشعور بالدوار بالإضافة إلى قيء واسهال تظهر خلال

ساعتين من تناول الفطر السام ثم تختفي، إلا أنها تعود مرة أخرى إذا تناول المصاب مشروب كحولي خلال الـ 48 ساعة التالية للتسمم.

ومن السموم الفطرية المحللة لخلايا الجسم هناك سم الجيرومترين **Gyromitrin** الذي يكونه فطر عيش غراب المورشيلا الكاذبة *Gyromitra esculenta*، وعند تحلل سم الجيرومترين مائياً في المعدة ينتج مركب أحادي ميثيل هيدرازين **Mono-methylhydrazin** الذي يعتبر مادة سامة تؤثر على الجهاز العصبي المركزي وهو السم الوحيد من سموم الفطريات المأكولة الذي تتميز أعراضه بحدوث حمى شديدة.

ومن الفطريات المأكولة الأخرى جنس مورشيلا *Morchella* وهو من الفطريات الزقية **Ascomycota**، وهو من الفطريات الصالحة للأكل وذات قيمة غذائية عالية وتتكون الثمرة الزقية في جنس مورشيلا من عنق يحمل في قمته قلنسوة يختلف شكلها ولونها حسب النوع ودراسة القطاع الراسي في القلنسوة يلاحظ وجود الطبقة الخصيبة والتي يترتب فيها صف واحد من الأكياس الزقية اسطوانية الشكل يتخللها عدد من الخيوط العقيمة ويحتوى كل كيس زقي على 8 جراثيم زقيه بيضيه الشكل. وكذلك هناك الكمأة *Truffle* وهي أيضاً من الفطريات الزقية **Ascomycota**، وتختلف عن عَيْشُ الغُرَاب بأن الجزء الثمري المأكول يبقى تحت سطح التربة ويتراوح قطره بين 2 – 10 سم، وداخل الثمرة الزقية تترتب مجموعة من الأكياس تعرف بالأكياس الزقية تتخللها خيوط عقيمة يحتوي كل كيس زقي على ثمانية أبواغ يتغير لونها عند نضجها والثمار الزقية لها تشبه الدرنات.

شكل رقم (117) فطر عَيْشُ الغُرَاب (يمين)، جنس *Amanita* من أنواع عَيْشُ الغُرَاب شديدة السمية (وسط أيمن) عن (**Madigan, *et al.* 2012**)، جنس *Morchella* (وسط أيسر)، الكمأة ***Truffle*** (يسار)، عن (**Prescott, *et al.* 2002**).

الطحالب Algae وعلاقتها بميكروبيولوجيا الأغذية:-

الطحالب مجموعة من الكائنات حقيقة النواة تحتوي على صبغة الكلوروفيل (ذاتية التغذية تقوم بعملية التمثيل الضوئي)، يوجد من الطحالب أكثر من 25000 نوع، وهي تعيش إما على سطح الماء أو في أعماقه، بينما توجد كميات قليلة منها في التربة أو على السطوح المعرضة للهواء والضوء، وللطحالب أهمية حيوية في البيئة حيث أن أغلبها تعيش في المياه ويقدر العلماء أن 80 % من عمليات البناء الضوئي تقوم بها الطحالب، وأن 90 % من الكربون المثبت على وجه الكرة الأرضية تقوم بتثبيته الطحالب، وهذا مؤشر على كمية الأكسجين التي تطلقها الطحالب نتيجة لذلك.

كما أن للطحالب أهمية حيوية واقتصادية فهي غذاء للأسماك حيث تعتبر الحلقة الأولى ضمن السلسلة الغــــذائية Food chains الموجودة في المياه والمتمثلة في البحار والمحيطات حيث تتغذى عليها كثير من الأسماك الصغيرة والحيوانات الدقيقة والعوالق planktons مما يعني أثراء الثروة السمكية، كما تستعمل الطحالب في بعض البلدان الأسيوية كاليابان والصين غذاءً للإنسان فهي تحتوي على نسبة عالية من البروتين 50 – 65 % تقريباً (على الأساس الجاف) كما تحتوي على بعض العناصر الثانوية التي تكون ضرورية لجسم الإنسان مثل الفيتامينات، وتقوم الطحالب بدور مهم في التقنيات الحيوية فمثلاً تستعمل الطحالب في امتصاص العناصر المعدنية الزائدة من المياه وبذلك تقلل من التلوث الحاصل بوساطة هذه العناصر في البحيرات والأنهار، كما استعملت الطحالب في إنتاج المواد الكيميائية وفي إنتاج المواد الطبية. وتتلخص أهمية الطحالب في كونها:

1- مصدر لغذاء الأسماك في البحار والأنهار والبحيرات.
2- تستخدم كغذاء وعلى الأخص الطحالب الحمراء *Rhodophyta* وبعض الطحالب البنية *Phaeophyta* في العديد من دول شرق آسيا، لاحتوائها على نسب عالية من البروتين ونسب جيدة من السكريات العديدة والفيتامينات وعلى الأخص فيتامينات A و D وبنسب أقل B، C و K.
3- تثبيت نيتروجين الهواء الجوي في التربة فتعمل زيادة خصوبتها وتحسين خواصها، كما تعمل بعض أنواع الطحالب على تحسين خواص التربة عن طريق أضافة مواد عضوية.
4- يستخدم بعض الطحالب في تصنيع مواد التجميل وبعض الأدوية والكيماويات.
5- البعض منها يفرز سموم (الطحالب المائية) مضره للأسماك والإنسان بصفة غير مباشرة.

<u>وتقسم الطحالب استناداً الى:</u>

1- التركيب العام للطحالب (شكلها، حجمها وتجمع خلاياها).
2- تركيب الخلية ونوع الصبغات وتركيبها الكيميائي ونوع المواد الغذائية المخزونة في الخلية وتركيبها الكيميائي.

3- الأجزاء المتخصصة للخلايا مثل نوع الأسواط (في الأنواع المتحركة)، عددها، وشكلها العام، والمظهر الخارجي للجدار الخلوي و تركيبه الكيميائي.
4- النظام الخلوي للطحالب ودورة الحياة والتغيرات التي قد تحدث لها في مختلف مراحل النمو.

<u>وبناء عليه تم تقسيم الطحالب إلى أقسام رئيسة ينطوي تحتها أصناف نوجزها فيما يلي:</u>

1- <u>قسم الطحالب الخضراء Division - *Chlorophyta* (Green algae):</u>

تعتبر الطحالب الخضراء أكبر وأكثر مجاميع الطحالب انتشاراً، وتختلف عن بقية أنواع الطحالب إذ يوجد بعضها في الثلوج وفي التربة وعلى جذوع الأشجار، وتكون بعضها متعايشة بالتكافل مع الكائنات الأخرى، ومعظمها يعيش في المياه العذبة، ومنها مجاميع قليلة تعيش في البحار، ويضم هذا القسم على 7000 نوع يكون أحادي الخلية أو متعددة الخلايا. ومن أمثلة هذه المجموعة طحلب *Dunaliella* وهو جنس من الطحلب وحيد الخلية يحوي سوطين وبلاستيدة خضراء يعيش في بيئات عالية الملوحة بشكل عام ويحوي الجنس على بعض الانواع التي تعيش في المياه العذبة. ويعد من اهم المصادر الرئيسة لإنتاج بيتا- كاروتين والجليسيرول، ونظرًا لتجمع كميات كبيرة من الكاروتين يبدو الطحلب بلون برتقالي-احمر وليس أخضر، وتحوي الكتلة الحيوية على 50 – 60 % تقريباً من البروتين (على الأساس الجاف)، وتحوي انواع الجنس على صبغات معقدة، وينتج افراد الجنس عددًا من صبغات الكاروتينات والزانثوفيلات. ومن أنواع هذا الجنس *D. bardawil* ويسمى ايضًا *D. salina* ويعد من المصادر الرئيسة لإنتاج الكاروتينات وتعتمد الكميات الناتجة عل ى الظروف المحيطة واهمها شدة الاضاءة والحرارة والملوحة والتي يمكن ان تصل الى 14 %، وينتج الطحلب دهون التي تصل الى 6 – 18 % عند تنميته في بيئة ذات ملوحة عالية وتتكون الدهون المنتجة من كميات متساوية من الدهون المتعادلة والقطبية، وينتج الطحلب ايضًا عددًا من الفيتامينات مثل الثيامين، البايريدوكسين والرايبوفلافين وحامض النيكوتنيك ومستويات عالية من البايوتين وفيتامين E، وبعض هذه الفيتامينات يمكن ان تفرز الى الوسط المحيط. كما ينتج الطحلب الجليسيرول اعتمادًا على ملوحة البيئة المحيطة فيصل اقصى انتاج عندما يكون تركيز كلوريد الصوديوم 21 % إلى حوالى 50 % من الوزن الجاف.

أما الجنس *Scenedesmus* فيعد من الطحالب المهمة للاستعمال البشري نظرًا لغناها بالمواد الغذائية فهي تحوي على نسبة عالية كما يستخدم في إنتاج الكاروتينات.

والجنس *Botryococcus* وحيد الخلية الذي تستعمل بشكل رئيس لإنتاج الهيدروكربونات ومن أهم أنواعه *B. braunii* الغني بالدهون التي قد يصل محتواها الى 36 – 51 % من وزنه الجاف ويستعمل لإنتاج الهيدروكربونات (النفط الطحلبي) على النطاق التجاري.

كذلك الجنس *Chlorella* الذي يستعمل لإنتاج الصبغات والبيتا – كاروتين والليسيثينات وعدد من الفيتامينات الذائبة في الماء وبعض المضادات الحيوية ضد البكتيريا.

2- قسم الطحالب الحمراء Division - *Rhodophyta* (Red algae):

طحالب متعددة الخلايا وبعضها احادية الخلايا تمتلك 3900 نوعاً تعيش في المياه المالحة ماعدا 100 نوع يعيش في المياه العذبة، توجد هذه الطحالب عادةً ملتصقة بالطبقة السفلية من المياه، ومن أمثلة هذه المجموعة *Porphyridium* وهو طحلب وحيد الخلية ينتج كميات كبيرة من السكريات العديدة والأحماض الدهنية الاساسية والعديد من المواد الكيمياويات المهمة، ومن أنواعه المهمة اقتصادياً *P. cruentum* (*P. purpureum*) وكذلك *P. aerugineum* المستخدمين لإنتاج حامض الاراشيدونيك Arachidonic acid والسكريات المتعددة المعروفة باسم kelzan والتي تعد من العوامل المثخنة المستعملة في الاغذية.

ومن أجناس هذه المجموعة المستخدمة كغذاء للإنسان *Porphyra* وهو من الادغال البحرية او ما يسمى بالطحالب الكبيرة، يستعمل بمثابة غذاء رئيس في دول الشرق الاقصى، نظرا لاحتوائه على كميات معتبرة من البروتينات والفيتامينات والعناصر المعدنية.

3- قسم الطحالب الذهبية Division - *Chrysophyta*:

هذا القسم يحتوي على الطحالب أحادية الخلية تتضمن الأصناف التالية:

1- صِنْف الطحالب الذهبية Class - golden algae: ومعظم أفراد هذا الصنف سوطيه (متحركة) وموجودة في المياه العذبة والمالحة وتحتوي على 500 نوعاً.

2- صِنْف الطحالب الصفراء المخضرة Class - Yellow green algae: معظمها غير متحركة وموجودة في المياه العذبة المالحة قليلاً والمياه المالحة ويحتوي على 550 نوعاً.

3- صِنْف الدايتومات Class - *Bacillariophyceae* (diatoms): أفراد هذا النوع من الطحالب لا يمتلك اسواطاً وإنما هي هائمات موجودة في المياه العذبة والمالحة، تمتاز بامتلاك جدار خليتها أغلفة سيلكونية تحتوي على انخفاضات دقيقة معقدة تستعمل في تحديد الأنواع المختلفة.

ومن أجناس هذه المجموعة *Nitzchia* وهو من الدايتومات الطحلبية البحرية والذي تفرز بعض أنواعه مثل *N. pungens* و *N. pseudodelicatissia* سموم (من أهمها حامض الدوميك Domoic acid) تنتقل الى الأسماك والتي تسبب التسمم عند تناولها.

4- قسم الطحالب ثنائية السوط Division - *Pyrrophyta* (dinoflagellates):

إنّ معظم أفراد هذا القسم أحادية الخلية ثنائية السوط أكثرها توجد كهائمات في المياه العذبة والمالحة. تمتلك الطحالب الثنائية الاسواط صفائح سليلوزية سمكية درعيه، ويحتوي هذا القسم 1000 نوع، إنّ هذا النوع من الطحالب يفرز مادة سامة لكائنات مائية صغيرة ولاسيما الكائنات الموجودة في قاع البحر تؤدي إلى هلاكها.

5- قسم الطحالب البنية (brown algae) *Phaeophyta* - Division:

طحالب متعددة الخلايا تنمو في المياه المالحة ، أحجامها تتراوح من مجهرية إلى 60 متراً طولاً من الأعشاب البحرية ، هذا القسم يحتوي على 1500 نوعاً.

6- قسم الطحالب اليوغلينية (Euglenoids) *Euglenophyta* - Division:

وهي طحالب أحادية الخلية ماعدا *Colacium* أكثرها تعيش في المياه العذبة تتراوح أحجامها من أقل من 10 مايكرو متر في الطول إلى أكثر من 500 مايكرومتر، يحتوي هذا القسم على أكثر من 800 نوع، تمتاز أفرادها بكونها مسوطة وتحوي على صبغه كلوروفيل (أ و ب) أما الغذاء المخزون فيكون بشكل حبيبات باراميلون Paramylon (سكريات متعددة تتكون على شكل حبيبات بيضية)، يتكاثر معظم أفرادها بالانشطار الطولي الذي يمتد من الجزء العلوي للجسم ويتجه إلى نهاية الجسم.

7- قسم الطحالب الخضر المزرقة (blue green algae) *Cyanophyta* - Division:

تضم العديد من المراجع هذه الكائنات بدائية النواة blue green algae مع الطحالب التي هي من الكائنات حقيقية النواة، إلا أن كتب التصنيف الحديثة تصنفها مع الكائنات بدائية النواة وتضمها مع البكتيريا وقد اصبح اسمها *Cyanobacteria* بدلاً من blue green algae وهذا ما ذكرناه سابقاً، ولعدم ذكرنا لأهم أجناس وأنواع السيانوبكتيريا *Cyanobacteria* من قبل فسيتم ذكرها هنا مع التأكيد على انتمائها للسيانوبكتيريا *Cyanobacteria*.

من الأجناس المهمة التي تذكرها عدد من المراجع ضمن هذه المجموعة جنس *Anaebaena* الذي ينتج الطحلب عددًا من الفيتامينات، وجنس *Nostoc* الذي يستعمل عادة مادة مخصبة للأراضي الزراعية، ويقوم الطحلب بإنتاج وافراز عدد من الفيتامينات، إضافة إلى جنس *Spirulina* الذي يستعمل في مجال الاغذية والمواد الصيدلانية.

الطفيليات المعوية Intestinal Parasites المنتقلة عن طريق الأغذية:-

هناك عدد من الأمراض المنتقلة عن طريق الأغذية من جراء الإصابة بعدوى الطفيليات المعوية Intestinal Parasites والتي تتمثل بالطفيليات الأَوَّلِيّة Protozoan parasites (وهي أحياء مجهرية تنتمي لمجموعة الأحياء المجهرية حقيقية النواة Eucaryota) وكذلك الديدان الطفيلية Helminthes التي تشمل كل من الديدان المسطحة والديدان الاسطوانية والتي على الرغم من عدم انتمائها إلى مجموعة الأحياء المجهرية إلا أن ذكرها هنا جاء بالضرورة كونها من الطفيليات المعوية Intestinal Parasites التي تنتقل إلى الإنسان عن طريق الأغذية.

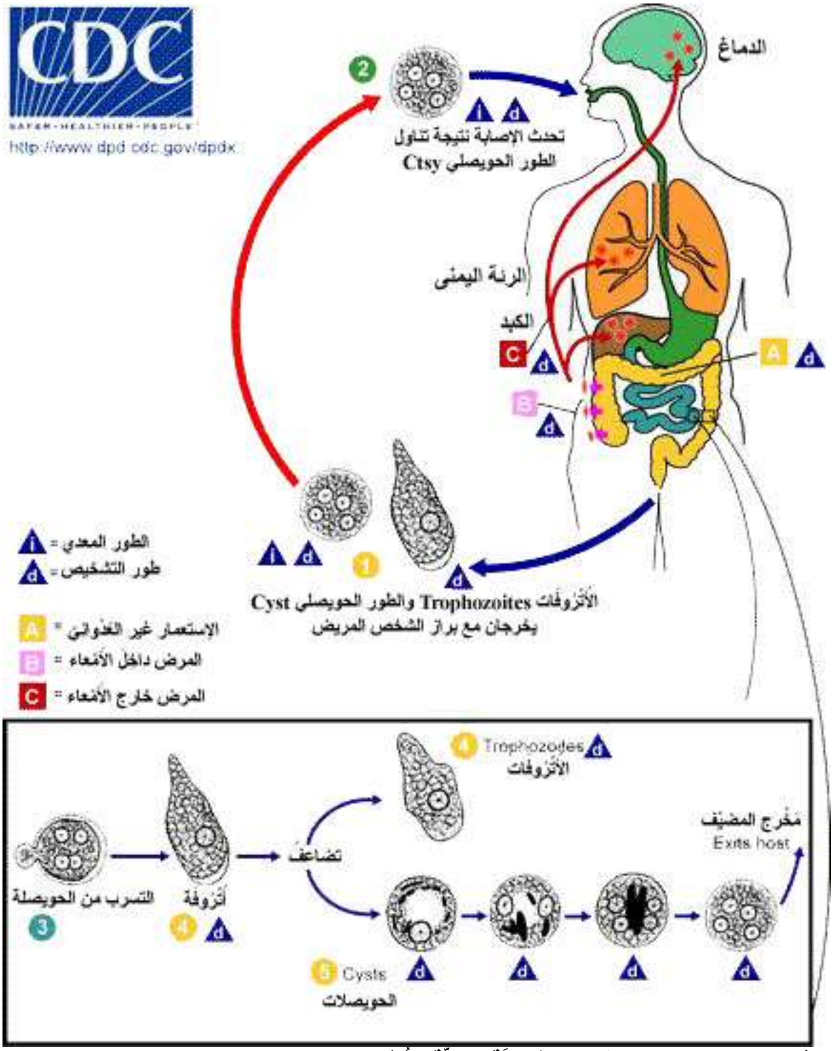
الطفيليات الأَوَّلِيّة Protozoan parasites:

تنقل الطفيليات الأَوَّلِيّة عن طريق الاغذية والمياه الملوثة وتتسبب بالإصابة بأمراض ذات خطورة للإنسان، ومن أكثر هذه الأمراض انتشاراً ما يلي:

1- داءُ الأَميبات Amoebiasis:

ويسببه طفيل أولي يعرف بالمُتَحَوِّلَة الحَالّة للنُسُج *Entamoeba histolytica* (الأميبا الحَالّة للنُسُج) والتي تتواجد بثلاثة أشكال حسب مراحل دورة حياتها وهي الأُتْرُوفَة Trophozoite (وهو الطور النشيط "المعدي" من دورة حياة الطفيليات الأَوَّلِيّة Protozoa)، وكذلك طور ما قبل التحوصل Precytic stage والطور الحويصلي Cyst (الأكياس) وهو الذي ينتقل عن طريق الاغذية والمياه الملوثة هو طور الإصابة الفعال، ولا يوجد الطور النشط إلا داخل العائل أو في البراز الطازج، بينما تبقى الأكياس (الطور الحويصلي Cyst) حية خارج العائل في الماء والتربة وعلى الأطعمة، وخاصة في ظروف الرطوبة. ويسبب الطور الحويصلي Cyst الأكياس العدوى التي تحدث بابتلاع الأكياس البالغة في الغذاء أو الماء أو الأيدي الملوثة بالبراز، ثم يحدث تحرر للأُتْرُوفَات Trophozoites في الأمعاء الدقيقة ثم تنتقل إلى الامعاء الغليظة، تتضاعفُ الأُتْرُوفَات بالانشطار الثنائي ثم تتحوصل داخل الأمعاء الغليظة وتخرج مع براز الشخص المريض لتلوث الأغذية ومياه الشرب، وهكذا تنتشر العدوى مسببة للزحار الأميبي.

وتمتلك *E. histolytica* إنزيمات قادرة على تحليل نسيجِ الأمعاء، وهنا يُمْكِنُ في حالاتٍ نادرة أَنْ تَخترقَ جدار الامعاء، وتنتقل مع مجرى الدم إلى أعضاء أخرى في الجسم وهنا تكون الإصابة في غاية الخطورة إذا ما أنتقل الطفيل من الأمعاء إلى أعضاء أخرى كالكبد (وهو العضو الأكثر شيوعاً في الإصابة بعد الأمعاء) فيتسبب بالإصابة بالخراج الكبدي وقد ينتقل إلى أعضاء أخرى كالرئة (الرئة اليمنى في الغالب نتيجة التآكل المباشر في الحجاب الحاجز من خراج الكبد) أو إلى المخ حيث تتسبب تُسبّبُ بحدوث جروحَ وقُرَحَ عميقةَ ومميتة، وفي أندر الأحوال تتكون تكتلات (أورام أميبية) تؤدى إلى انسداد معوي. والشكل التالي المقتبس عن مركز مُكافَحَةِ الأَمْراض Center for Disease Control يوضح دورة حياة طفيل *E. histolytica*.



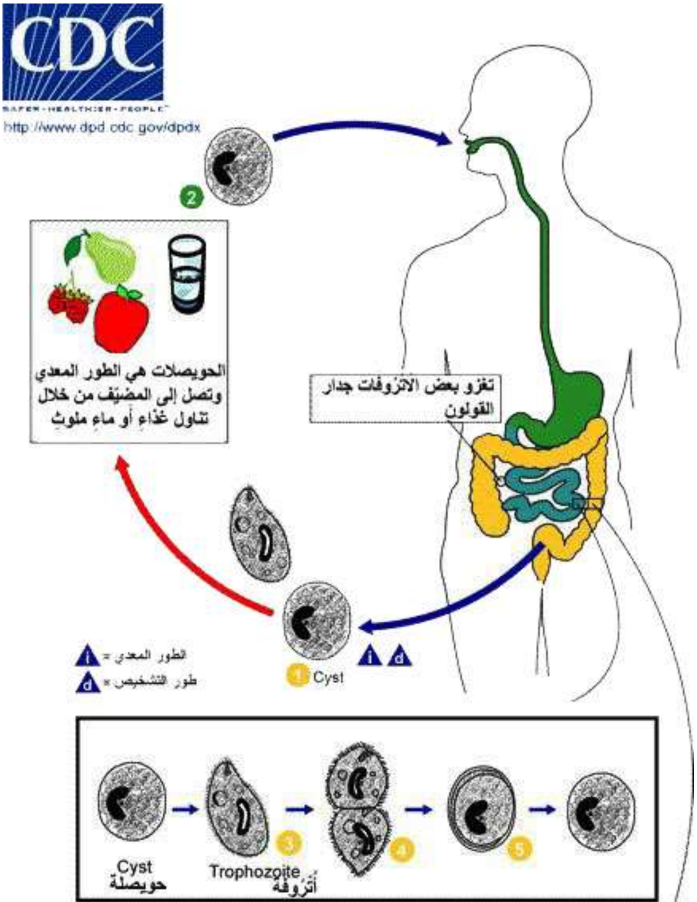
شكل رقم (118) دورة حياة طفيل المُتَحَوِّلَة الحَالّة للنُسُج *Entamoeba histolytica*، عن (CDC)
.http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

ينتقل داءُ الأَميبات Amoebiasis بتلوث ماء الشرب والأطعمة بالبراز، وأيضا بالتلامس المباشر مع الأدوات المتسخة والأيدي المتسخة وبالاتصال الجنسي. ويشخص هذا الداء بالعثور على الأكياس (الطور الحويصلي) مع البراز، وبما أن هذه الأكياس لا تنزل بانتظام فلا بد من فحص 3 عينات براز على الأقل، وفي العدوى الشديدة يمكن رؤية الطور النشط (الأُتْرُوفَات Trophozoites) في البراز الطازج. كما يمكن الاستعانة أيضا بالفحوص المصلية للعدوى طويلة الأمد. وبما أن هناك أنواع أخرى من هذا الجنس مثل *Entamoeba coli* و *E. hartmanni* تعيش في القناة الهضمية لكنها تعتبر غير مرضية بل تعيش معيشة تكافلية، فمن المهم تمييز أكياس *E. histolytica* من أكياس هذه الأنواع غير المسببة للأمراض، عن طريق مظهرها.

2- داءُ القِرْبيَّات Balantidiasis:

ويسمى أيضاً الزحـار القِرْبِيّ Balantidial dysentery يسببه طفيل القِرْبِيَّـة القولُونِيَّة *Balantidium coli* ويعتبر اكبر الطفيليات الأَوَّلِيّة حجماً حيث يمكن ملاحظتـه بـالعين المجردة، ويعتبر الخنزير المضيف الطبيعي لهذا الطفيلي فـي العـادة تـأتي إصابة الإنسـان مـن الخنزير بعد ابتلاعـه للأكيـاس (الطـور الحويصـلي Cyst)، ومـن ثـم تسـتقر أُتْرُوفَـات Trophozoites هـذا الطفيل في تجويفِ الامعاء الغليظة وتتضاعف بالانقسام بالانشطار الثنائي ثم تتحوصل وتخـرج مـع براز الشخص المريض لتلوث الأغذية ومياه الشرب.

ولا يستوطن هذا الطفيل تجويف الامعاء الغليظـة فحسـب بـل انـه يغزو جدار القولـون أيضـاً مخترقاً الطبقة المخاطية وتحت المخاطية محدثاً آفات تشبه الآفات المتسببة عن غزو الأميبا الحَالّة للنُسُج مؤدياً إلى حدوث إسهال وكلمـا اتسـعت الأصـابة أصبحت أوعيـة الـدم متآكلـة مسببة الزحـار الدموي (الزحار القِرْبِيّ Balantidial dysentery).

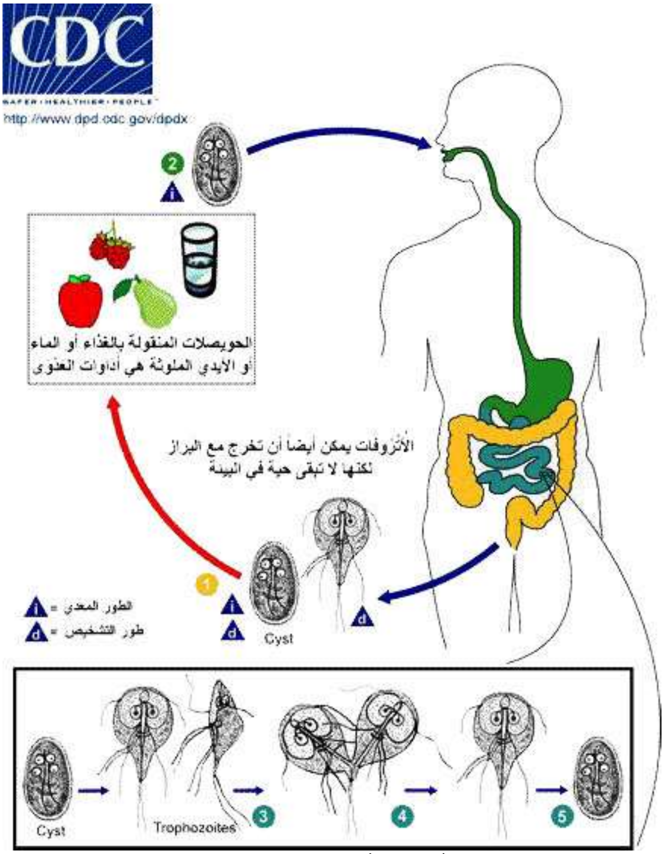


شكل رقم (119) دورة حياة طفيل القِرْبِيَّة القولُونيَّة *Balantidium coli*، عن (CDC) .http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

3- داءُ الجِيارْدِيَّات Giardiasis:

ويسببه طفيل الجياردية المعوية *Giardia intestinalis* (*G. lamblia*) وهو الطفيل الممرض الوحيد في مجموعة السوطيات المعوية، ويتكاثر هذا الطفيل في القسم الأعلى من الأمعاء الدقيقة وأحياناً القنوات الصفراوية Bile ducts و المرارة Gallbladder، ويقوم بامتصاص العناصر الغذائية الموجودة في الغذاء المهضوم ويعيق امتصاصها، ويتسبب هذا المرض بحالة من الإسهال الدُهْنِيّ خصوصاً لدى الأطفال وكذلك نقصان في الوزن والْتِهابُ الإثْناعَشَرِ إضافة إلى الآم في البطن و التهاب المرارة و القنوات الصفراوية أحيانا.

تحدث الإصابة عندما تبتلع الحويصلات (الأكياس) الناضجة Mature Cysts مع الغذاء أو الماء الملوث ثم تحرر الأُتْرُوفَات Trophozoites التي تتكاثر بالانقسام الثنائي البسيط، وعند وصولها إلى القولون تبدأ بالتحوصل لتكون حويصلات تخرج مع البراز. وقد تؤدى الإصابة إلى حدوث الإسهال خلال أسبوع من ابتلاع الحويصلات (الأكياس) الناضجة، وعادة ما يدوم المرض من أسبوع إلى اثنين، إلا أن هناك أنواعا من العدوى المزمنة تستمر شهور أو سنوات.

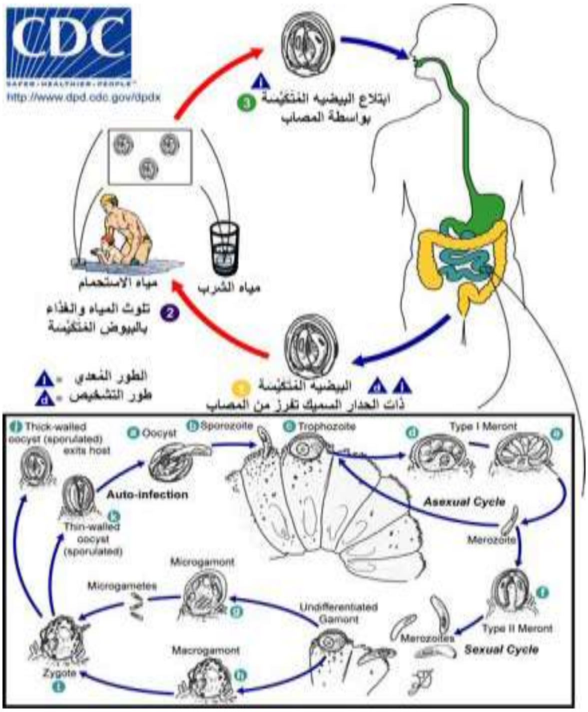


شكل رقم (120) دورة حياة طفيل الجياردية المعوية *Giardia intestinalis* (*G. lamblia*)، عن (CDC) http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm.

4- داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ Cryptosporidiosis:

تسببه طفيليات *Cryptosporidium parvum* و *C. hominis* و *C. muris*، ولهذه الطفيليات دورة حياة معقّدة تَتضمّنُ الطور المعدي (الأُتْرُوفَة)، الطور الجنسي، والبَيضَةُ المُتَكَيِّسَة Oocyst. ويَحْدثُ العدوى لها الداء بشكل رئيسي بالماءِ الملوث، كما تظهر هذه الطفيليات على أي طعام يلمسه شخص مصاب، ويكون معدل حدوث داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ Cryptosporidiosis أعلى في رياض الأطفال التي تقوم بتقديم الطعام فيها، كما أن الخضروات الورقية السلطة المسمدة بالسماد العضوي أو المروية بمياه ملوثة بالمجاري تعد مصدرا محتملا لعدوى الإنسان.

يصيب داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ Cryptosporidiosis الأمعاء أو الجهاز التنفسي، ويتميز داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ المعوي بالإسهال المائي الشديد، إلا أنه قد يخلو من الأعراض أيضا، أما داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ الذي يصيب الرئة والقصَبَة الهوائية (الرُّغامى) فيرتبط بالسعال وفي أحيان كثيرة بالحمة منخفضة الدرجة، وكثيرا ما تترافق هذه الأعراض مع اضطراب معوي شديد. أن داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ المعوي له فترةُ تحضين حوالي أسبوع واحد، والمرضى ذات المناعة الجيدة يعَانوا من إسهال محدود يدوم من أسبوع إلى اسبوعين تفرز خلالها الأكياس البيضيه المُتَكَيِّسَة Oocyst المُشَـكَّلة حديثاً في الغائطِ، ولا يعرف حتى اليوم دواء فعال لعلاج داءُ خَفِيَّاتِ الأَبْواغ، لكن في الغالب يشفى هذا الداء من تلقائه في معظم الأصحاء بعد إسهال يدوم 2 – 4 أيام، لكن الإسهال في بعض الأوبئة التي وقعت في رياض الأطفال دام من أسبوع إلى 4 أسابيع، في حين أن الأشخاص ناقصي المناعة (خاصة مرضى الإيدز) قد يدوم معهم المرض مدى الحياة، مع مساهمة الإسهال المائي الشديد (والذي يُمكنُ أَنْ يَكُونَ حادَّ ودائم) في التسبب بالجفافِ والنحولِ وإحداث الوفاة، كما قد يؤدى غزو الطفيل للجهاز التنفسي أيضا إلى الموت.



شكل رقم (121) دورة حياة طفيليات *Cryptosporidium spp.*، عن (CDC) .http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

5- داءُ المُقَوَّسات Toxoplasmosis:

ويسببه طفيل *Toxoplasma gondii* وهو من الطفيليات السائدِة الانتشار في العالمِ. وتكون القطط هي العائل الأساسي لهذا الطفيل، وتحدث العدوى عن طريق تناول غذاء ملوث ببراز القط حاوي على الأكياس الناضجة والمعدية، أو تناول لحوم غير مطبوخة جيدا بها الطور الحي و المتكيس، وخلال العدوى الحادة للقطط فإن القطة الواحدة قد تخرج مع البراز عدد كبير من الطفيليات يصل إلى حوالي 100 مليون/يوم، وهذا الطور الناضج المعدي والذي يحتوى على الخلايا الناشئة من الانقسام يكون معدي ومقاوم للظروف ومن الممكن أن يعيش لسنوات في التربة. وعند ابتلاع الأكياس الناضجة (المعدية) يتم هضمها بتأثير العصارة المعدية لينطلق الطور الموجود بهذه الأكياس والذي يخترق الغشاء المبطن للأمعاء الدقيقة، وينتقل هذا الطفيل عبر مشيمة الأم المصابة إلى الجنين، وقد يتسبب في إسقاط الجنين في المرأة الحامل، أو ولادة جنين تام النضج، لكنه يعاني من استسقاء الرأس، والتهاب شبكية ومشيمة العين، وتكلسات دماغية تودي إلى التخلف العقلي.

6- طفيليات أَوَّلِيّة معوية أخرى Other protozoan intestinal parasites:

هناك مجموعة من الطفيليات الأَوَّلِيّة المعوية الأخرى تنتقل إلى الإنسان عن طريق الأغذية ومن أهمها *Cyclospora cayetanensis*، *Isospora belli*، *Sarcocystis hominis* و *Sarcocystis suihominis* وتحْدثُ العدوى بهذه الطفيليات عند ابتلاع البَيضَةُ المُتَكَيِّسَة لها Oocyst.

الديدان الطفيلية Helminthes:

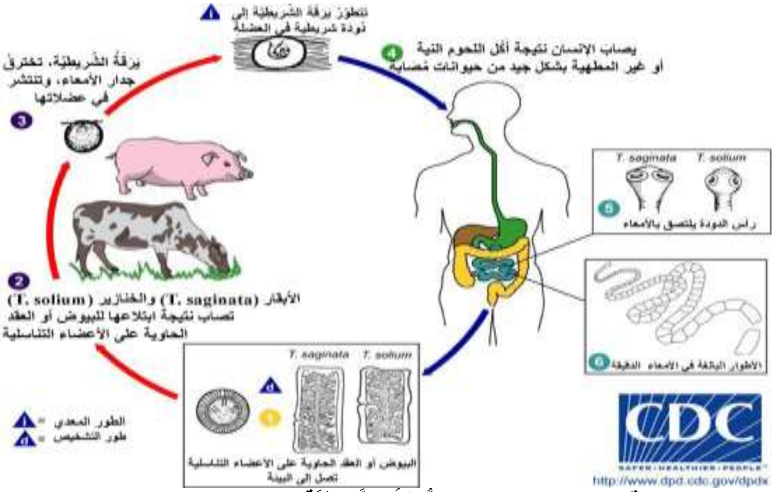
تشمل الديدان الطفيلية Helminthes كل من الديدان المسطحة والديدان الاسطوانية وهي لا تنتمي إلى مجموعة الأحياء المجهرية إلا أن ذكرها هنا جاء بالضرورة كونها من الطفيليات المعوية Intestinal Parasites التي تنتقل إلى الإنسان عن طريق الأغذية. ومن أكثر هذه الحالات انتشاراً ما يلي:

1- داءُ الشَّراطِيَّات Cestodiasis:

يتسبب بهذا الداء الدُّوْدَةُ الشَّرِيطِيَّة Taenia، وهي نوع الديدان الطفيلية، وسبب تسميتها بالشَّرِيطِيَّة كونها مفلطحة غير مستديرة (جسمها شريطي طويل)، من أنواعها الدُّوْدَةُ الشَّرِيطِيَّة الخنزيرية *T. solium* والدُّوْدَةُ الشَّرِيطِيَّة البقرية *T. saginata*.

تتسبب الدُّوْدَةُ الشَّرِيطِيَّة الخنزيرية *T. solium* بأذى للغشاء المخاطي المبطن للقناة الهضمية في مواضع التصاقها كونها تحتوي على كلاليب (خطاطيف) تتواجد حول منطقة الفم في منطقة الرأس للدودة وقد تؤدى إلى انسداد التجويف المعوي، وبسبب امتصاصها للعناصر الغذائية في الأمعاء تتسبب في احداث ضعف عام لدى المصابين بها حيث يبلغ طولها ما بين 3 - 5 أمتار.

أما الدُّوْدَةُ الشَّريطِيَّة البقرية *T. saginata* فتختلف عن نضيرتها الخنزيرية في أنها لا تحتوي على الكلاليب (الخطاطيف) التي تخدش الغشاء المخاطي للأمعاء ولكنها تمتص عناصر غذائية مهضومة أكثر بسبب طولها الذي يتراوح طولها ما بين 4 - 8 أمتار.



شكل رقم (122) دورة حياة الدُّوْدَةَ الشَّرِيطِيَّة Taenia، عن (CDC) .http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

2- داءُ الصفر (الاسكارس) Ascariasis:

يتسبب في هذا الداء نوع من الديدان الاسطوانية (الخيطية) الأكثر انتشارا في المناطق الحارة وخصوصا بين الأطفال يدعى الصفر الخراطيني *Ascaris lumbricoides*، ويطلق على هذه الديدان أيضاً ثعابين البطن لشدة شبهها بالثعابين الصغيرة، وينتشر داءُ الصفر (الاسكارس) بالأغذية الملوثة ببراز المصابين، وبعد ابتلاع بويضات هذه الديدان تفقس وتخرج منها اليرقات داخل الأمعاء، لكن هذه اليرقات لا تستطيع إتمام تطورها إلى دودة كاملة داخل الأمعاء فتخترق بطانة الامعاء وتصل إلى الدم ومنه إلى الرئتين ثم تصل إلى الشعب الهوائية ثم القصبة الهوائية فالبلعوم ثم يتم ابتلاعها لتهبط مرة أخرى داخل الجهاز الهضمي حيث تقاوم العصارة المعدية) ثم تصل إلى الامعاء الدقيقة لكي تنمو إلى طور الديدان اليافعة التي تضع البيض (الذي يغادر الجسم مع البراز) وتتكرر دورة الحياة.

3- داءُ الشَّعْرينات Trichinellosis:

مرض طفيلي سببه نوع من الديدان الشَّعْرِينَة *Trichinella spp.* وتحدث العدوى عندما يأكل الإنسان اللحم المحتوي على حويصلات الطفيل المعدية حيث يذوب الغلاف الصلب للكيس بفعل العصارة المعدية وتخرج الديدان التي تعبر إلى الأمعاء الدقيقة وخلال 1 – 2 يوم تصبح تامة النمو، بعد التزاوج تضع الإناث البالغات البيوض التي تتطور إلى ديدان غير ناضجة تتحرك من خلال الشرايين إلى العضلات، فيها العضلات تلتف الديدان في شكل كرة وتتكيس (تصبح محاطة بشكل كبسولة) وتحدث العدوى إذا استهلكت اللحوم المحتوية على هذه الأكياس.

الجزء الثاني

ميكروبيولوجيا الأغذية

Food Microbiology

الفصل الثالث

الغذاء: تركيبه الكيميائي، مصادر تلوثه، العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية فيه ووسائل حفظه من التلف الميكروبي.

Food: Chemical Composition, Sources of Contamination, Factors That Affect Microbial Growth and Food Preservation

الغذاء هو ما يتناوله الإنسان من مأكولات ومشروبات تحتوي على العناصر الغذائية Nutrients التي تشمل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والفيتامينات، والعناصر المعدنية، والماء (هي المواد الكيميائية التي يحصل عليها الإنسان من غذائه)، حيث يحتاجها الجسم لإمداده بالطاقة ومساعدته على النمو والتكاثر وصيانة وإصلاح الأنسجة التالفة وتنظيم العمليات الحيوية، ونقص أي من هذه العناصر الغذائية يؤدى إلى حدوث حالة مرضية.

والمتخصص في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية **Food Microbiology** بالإضافة إلى إلمامه بعلم الأحياء المجهرية، يجب أن يُلم بعلوم كيمياء وتحليل الأغذية وطرق وتقنيات حفظ الأغذية إضافة إلى عمليات التصنيع الغذائي.

التركيب الكيميائي للغذاء:

يتم معرفة التركيب الكيميائي للغذاء وتقدير العناصر الغذائية **Nutrients** في الأغذية باستخدام طرق تحليل مختلفة من أسهلها وأوسعها انتشاراً طريقة التحليل التقريبي للغذاء **Proximate Analysis of Food** التي تهدف لمعرفة المكونات الرئيسة من العناصر الغذائية والتي تشمل الماء (الرطوبة)، البروتين (النيتروجين)، الزيوت والدهون (مستخلص الأثير)، الكربوهيدرات (المستخلص الخالي من النيتروجين والألياف الخام)، العناصر المعدنية (الرماد).

1- <u>الماء Water</u>:

الماء عنصر ضروري للحياة له وظائف حيوية مهمة ومتعددة كما أنه ضروري لإتمام جميع التفاعلات الكيميائية في الخلايا الحية، ويشكل نسبة كبيرة من تركيب الخلايا الحية، وصدق الله العظيم إذ يقول في محكم كتابه ﴿أَوَلَمْ يَرَ الَّذِينَ كَفَرُوا أَنَّ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضَ كَانَتَا رَتْقاً فَفَتَقْنَاهُمَا وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ كُلَّ شَيْءٍ حَيٍّ أَفَلَا يُؤْمِنُونَ﴾ صدق الله العظيم [الأنبياء: 30].

ويوجد الماء في الغذاء على هيئة ماء حر **Free** أو ماء مرتبط **Compound**، وفي طرق التحليل المختلفة يتم تقدير نسبة الماء الحر الذي تعرف نسبته بمصطلح نسبة الرطوبة **Moisture Percent** أو المحتوى المائي **Water Content**، بتجفيف عينة الغذاء في أفران

التجفيف العادية على درجة حرارة 105°م لعدة ساعات في حالة الأغذية التي لا تتأثر بحرارة التجفيف المستخدمة والتي تجاوز 100°م، أما في حالة الأغذية الحساسة لحرارة التجفيف مثل الأغذية الحاوية على السكريات التي تتأثر بالحرارة فيتم تحفيفها في أفران التجفيف تحت التفريغ على درجة حرارة تقارب 70°م لعدة ساعات. وتتأثر الكثير من صفات الأغذية وقيمتها الغذائية وقابلية حفظها بمحتواها المائي فهو مقاس أساسي لمعرفة قابلية الأغذية المختلفة للفساد حيث يلزم وجود الماء الذي يعمل كوسط تذوب فيه المواد الغذائية الداخلة والخارجة من وإلى الخلية كما يدخل في التفاعلات الحيوية للخلايا الميكروبية، ولذلك فنسبة الرطوبة أو المحتوى المائي للغذاء يحدد طبيعة نمو الأحياء المجهرية في الأغذية المختلفة، لذلك يتم حفظ العديد من الاغذية بتجفيفها لتقليل محتواها المائي لمستوى يكون فيه غير كافي لنمو ونشاط الاحياء المجهرية والتفاعلات الانزيمية المسببة لتلف وفساد الغذاء. والجدول التالي يوضح محتوى بعض الأغذية من الماء.

جدول رقم (7): يوضح محتوى بعض الأغذية من الماء*

الغذاء	الماء %	الغذاء	الماء %	الغذاء	الماء %
الطماطم والخَسّ	95	الدجاج	70	الزبد والمارجرين	16
الكُرُنْب (المَلْفُوف)	92	اللحوم	65	دقيق القمح	12
البرتقال	87	الجبن	37	الأرز	12
الحليب	80	الخبز الأبيض	35	البن المحمص	5
البطاطس	78	المربى	28	الحليب المجفف	4
الموز	75	العسل	20	السَمْن	0

* المصدر (deMan, 1999).

2- البروتينات Proteins:

هي مجموعة من المركبات التي تتكون من وحدات بناء تعرف باسم الأحماض الأمينية، وهذه الأحماض الأمينية ضرورية لعمليات النمو وصيانة الخلايا، منها أحماض أمينية أساسية تؤخذ من الغذاء ولا يستطيع الجسم تكوينها، وأخرى غير أساسية يمكن للجسم أن يكونها خلال عمليات الأيض. والبروتينات إما أن تكون بروتينات حيوانية مثل اللحوم والأسماك والبيض والحليب ومشتقاته أو بروتينات نباتية مثل الحبوب والبقوليات. وتحتوي البروتينات الحيوانية على جميع الأحماض الأمينية الأساسية على عكس البروتينات النباتية التي تفتقر إلى بعضها، ما يستدعي خلط أكثر من نوع من الحبوب والبقوليات لرفع القيمة الغذائية والحصول على جميع الأحماض الأمينية الأساسية.

وتحتوي البروتينات على نسب ثابتة من النتروجين بحسب نوع هذه البروتينات، وبالتالي يمكننا تقدير نسبة البروتين في عينة الغذاء بتقدير كمية النيتروجين وفقاً لطريقة شهيرة ومعتمدة في تحليل الأغذية تعرف بطريقة كلدال **Kjeldahl method**، وفي هذه الطريقة يتم هضم عينة الغذاء المراد تحليله بواسطة حامض الكبريتيك المركز الذي يقوم بهضم البروتين إلى نيتروجين في وحدة الهضم، ويتحول النيتروجين الموجود في البروتينات (وغيرها من المواد النيتروجينية) إلى كبريتات الأمونيوم والتي تتحول بدورها إلى أمونيا بمعاملتها مع محلول هيدروكسيد الصوديوم في وحدة التقطير (حيث يتكون جهاز كلدال من وحدة الهضم ووحدة التقطير)، وتستقبل الأمونيا الناتجة في محلول حامض البوريك ثم تعاير مع محلول حامضي مخفف وبذلك يمكن حساب الأمونيا الناتجة والنيتروجين، ونظرا لان البروتين يحتوي على نسبة ثابتة تقريباً من النيتروجين (حوالي 16%) فإنه يمكن تحويل قيمة النيتروجين الناتجة إلى البروتين بضربها بالعامل 6,25 في أغلب أنواع البروتينات إلا أن هذا العامل قد يتغير زيادة أو نقصان في الأغذية التي تقل فيها نسبة النيتروجين أو تزيد عن 16%.

3- الدهون والزيوت Fats and Oils:

هي مركبات عضوية تحتوي على الكربون والهيدروجين والأوكسجين، والدهون مصدر مكثف للطاقة الحرارية، حيث أن كل جرام واحد من الدهون يمنح الجسم ما يعادل 9 سعرات حرارية، كما تحتوي الدهون على الفيتامينات الذائبة في الدهن **Fat Soluble Vitamins**، والدهون إما أن تكون من مصادر نباتية وتكون ذات طبيعة سائلة وتعرف بالزيوت **Oils**، أو تكون من مصادر حيوانية وتكون أكثر صلابة ويُعرّفها البعض بالشحوم الحيوانية.

ويدل مصطلح مستخلص الأثير **Ether Extract** على محتوى الغذاء من الدهون والزيوت كمكونات رئيسة بالإضافة إلى المواد الذائبة في الدهن والتي تتواجد بكميات قليلة مثل الفيتامينات الذائبة في الدهن وكذلك بعض الأصباغ النباتية مثل الكاروتينات والزانثوفيل وغيرها من المواد التي تذوب في المذيبات العضوية مثل الإثير البترولي أو الإثير ثنائي الإيثيل أو الهكسان وغيرها من المذيبات العضوية الأخرى، باستخدام أجهزة خاصة مثل جهاز سوكسلت **Soxhlet** الذي يعتمد على مبدأ استخلاص الدهن من عينة الغذاء نتيجة ذوبانه في المذيبات العضوية المختلفة، ومن ثم تبخير المذيب المستخدم في الاستخلاص وتقدير وزن أو نسبة الدهن المتبقي.

4- الكربوهيدرات Carbohydrates:

هي مجموعة من المركبات الكيميائية تتكون من الكربون والأوكسجين والهيدروجين، وتكون نسبة الهيدروجين إلى الأوكسجين 1:2 كما هي نسبتهما في الماء (H_2O). يستخدمها الجسم في توليد الطاقة الحرارية التي يحتاجها كوقود للقيام بنشاطه الحيوي، وكل جرام واحد من الكربوهيدرات يمنح الجسم ما يعادل 4 سعرات حرارية.

ويمكن تقسيم الكربوهيدرات التي هي من أكثر العناصر الغذائية انتشاراً في الطبيعة إلى كربوهيدرات ذائبة و كربوهيدرات غير ذائبة (الألياف الخام)، وتعرف الكربوهيدرات الذائبة بالمستخلص الخالي من النيتروجين **Nitrogen-free extract** ويتم تقديرها في عينة الغذاء حسابياً من الفرق بين وزن العينة ومجموع أوزان الرطوبة والبروتين ومستخلص الإثير والألياف الخام والرماد، أما الألياف الخام (الكربوهيدرات غير الذائبة) فيتم تقديرها بغلي عينة الغذاء مع حامض تركيزه 1,25 % لمدة نصف ساعة، ثم إعادة غلي الجزء المتبقي مع قلوي تركيزه 1,25 % لمدة نصف ساعة أخرى بعدها يتم وزن المتبقي من العينة بعد ترشيحه لمعرفة كمية الألياف الخام. ومن أهم الأمثلة على الأغذية الغنية بالكربوهيدرات الخبز والأرز والبطاطس والمَعْكَرُونَة.

5- العناصر المعدنية Mineral Elements:

هي مواد كيميائية يحتاجها الإنسان بكميات بسيطة، لكنها مهمة للقيام بالتفاعلات الكيميائية الحيوية والحفاظ على توازن الحامض القاعدي للجسم وتدخل في تركيب الأنسجة والعظام. ويتطلب الجسم بعض العناصر المعدنية بكميات كبيرة نسبياً وتعرف بالعناصر الكبرى **Macroelements** ومن أمثلتها الكالسيوم والفسفور والبوتاسيوم والصوديوم، كذلك هناك عناصر يحتاجها الجسم بكميات قليلة جداً تعرف بالعناصر الصغرى **Microelements** ومن أمثلتها الحديد واليود والفلور والزنك والمنجنيز.

وتعرف مجموعة العناصر المعدنية الموجودة في عينة الغذاء في تقنية التحليل التقريبي للأغذية **Proximate Analysis** بالرماد، حيث يتم تقديرها بحرق (ترميد) عينة الغذاء في فرن صهر **Muffle Furnaces** على درجات حرارة عالية كفيلة بحرق كل المواد العضوية في الغذاء وتتراوح بين 550°م إلى 600°م لمدة 4 – 5 ساعات، ولا تعطينا كمية الرماد الخام فكرة عن العناصر المعدنية كل على حده بل يلزم تحليل إضافي لمعرفة مكونات الرماد من المعادن بطريقة خاصة لكل نوع من العناصر المعدنية.

6- الفيتامينات Vitamins:

مجموعة من المركبات العضوية المعقدة في تركيبها، يحتاجها الجسم بكميات ضئيلة وهي مهمة لعمليات الصيانة والنمو ومقاومة الأمراض وعمليات تمثيل الطاقة وتنظيم عمل الجسم وقد قسمت إلى: فيتامينات ذائبة في الدهن وتشمل فيتامينات **A**، **E**، **D**، **K**؛ وفيتامينات ذائبة في الماء وتشمل مجموعة فيتامينات **B** المركبة وفيتامين **C**. ونظراً لصغر الكميات التي تحتويها الأغذية من الفيتامينات فلا يمكن تقديرها باستخدام طريقة التحليل التقريبي للغذاء، ولكن توجد العديد من طرق التحليل المعتمدة لتحليل العناصر الغذائية كل على حدة وكذلك لتحليل العناصر الغذائية التي لا يمكن الكشف عنها بطريقة التحليل التقريبي **Proximate Analysis** مثل الفيتامينات أو العناصر المعدنية كل على حدة أو نوعية كل من الكربوهيدرات وأنواع البروتينات

المختلفة وتجزؤات الدهون وغيرها، ولمزيد من المعلومات حول هذا الموضوع يمكن العودة إلى أي من مراجع تحليل الأغذية الموجودة في المكتبة.

7- مواد أخرى:

تشمل الأغذية المختلفة على مواد أخرى غير العناصر الغذائية **Nutrients** التي تم تلخيصها أعلاه، وتشمل هذه المواد كل من مواد النكهة والمولد الملونة الأحماض العضوية والإنزيمات المختلفة، وجميع هذه المواد تعطي الغذاء خصائصه المميزة، وأي تغير فيها يؤدى إلى عدم تقبل المستهلك للغذاء بشكل أو بأخر.

التغيرات التي تحدث لمكونات الغذاء نتيجة نشاط الأحياء المجهرية:

إن أكثر ما يهم العاملين بحقل ميكروبيولوجي الأغذية الاهتمام بنمو وفعالية الأحياء المجهرية الموجودة في الأغذية المختلفة والتي تحدث فيها تغيرات كيميائية وحسية لمكونات الغذاء تشمل تحلل بروتينات الغذاء نتيجة الإنزيمات التي تفرزها الأحياء المجهرية إلى ببتيدات عديدة، وأحماض أمينية، وأمونيا أو أمينات **amines** إضافة إلى مركبات كبريتية H_2S وثاني أوكسيد الكربون CO_2، أما المواد الكربوهيدراتية المركبة فتتحلل إلى سكريات أحادية يتم استخدامها من قِبل الأحياء المجهرية كمصدر للطاقة والكربون ومن ثم تتحول إلى أحماض عضوية أو كحولات وغازات، في حين يتحلل الدهن والمواد الدهنية إلى جليسرول وأحماض دهنية، كما يحدث نتيجة عملية الأكسدة والاختزال التي تقوم بها بعض الأحياء المجهرية أن تتكون أحماض عضوية وكحولات والدهيدات أو كيتونات إضافة إلى غازات مختلفة.

كما أن التغيرات التي تحدث نتيجة نشاط الأحياء المجهرية في الغذاء تشمل أيضاً التغيرات التي تحدث في اللون او الطعم او الرائحة وكذلك التغيرات التي تجعل الغذاء غير مستساغ من قِبل المستهلك نتيجة تكون مواد ذات طبيعة هلامية لزجة على الأغذية كما يحدث نتيجة نمو البكتيريا المكونة للكبسولة (المحفظة) أو إفراز بعض الصبغات والمواد الملونة في هذه الأغذية أو غير ذلك من النشاطات التي قد تودي إلى إضفاء تغيرات غير مرغوبة على الغذاء أو تجعله غير صالح للاستهلاك نتيجة لما تفرزه بعض الأحياء المجهرية من مواد ضارة وسموم تؤثر على صحة المستهلك. كما قد يصبح الغذاء غير صالح للاستهلاك نتيجة تلوثه بمواد كيميائية خطرة أو سامة مثل المبيدات المستخدمة لمكافحة الآفات الزراعية أو بعض المعادن الثقيلة أو التلوث الاشعاعي.

لكن في الوقت نفسه يمكن استغلال بعض الأحياء المجهرية لإحداث تغيرات مرغوبة مسيطر عليها في المواد الغذائية المختلفة لتغير طبيعتها أو إطالة فترة حفظها أو تحويلها إلى مواد غذائية جديدة مختلفة عن المواد الغذائية الأصلية المصنعة منها كما يحدث في عمليات تصنيع الأغذية المتخمرة.

وفي الواقع يعرف الفساد بأنه أي تغير يحدث في الغذاء ويؤثر على خواصه سواء بسبب نشاط ميكروبي أو كيميائي أو ميكانيكي ضار مما يؤدي الى تغير غير الطبيعي في اللون او الطعم او الرائحة للمادة الغذائية نتيجة تغير خواصها الطبيعية وبالتالي رفضه من قبل المستهلك أو ايقافه من قبل الجهات الرقابية لعدم مطابقته للمواصفات الخاصة بشروط جودة وسلامة وصحة الغذاء، فبالتالي لا يقتصر فساد الغذاء على ما يحدث بواسطة الأحياء المجهرية، فقد تحصل تغيرات أخرى في الغذاء نتيجة لأسباب أخرى متعددة أهمها النشاطات الإنزيمية للإنزيمات الموجودة في الغذاء ذاته، أو نتيجة حدوث تفاعلات كيميائية كالأكسدة والتحلل والتفاعل بين بعض مكونات المادة الغذائية أو بين بعض مكونات الغذاء ومادة التعبئة، كتلك التفاعلات التي تحدث بين محتويات الغذاء في العبوة المعدنية مع معدن هذه العبوة حيث يتحد الكبريت مع معدن العلب ويكون كبريتوز الحديد الأسود، أو التفاعل بين محتويات الغذاء مع السطح الداخلي لمعدن العلبة التي تحتويه مما يؤدي إلى إنتاج غاز الهيدروجين وانتفاخ تلك العبوات، إضافة إلى تأثير عدد من العوامل الطبيعية الأخرى كدرجة الحرارة والرطوبة والضوء وتفاعل أكسجين الهواء الجوي مع الغذاء مما يؤدى إلى اسمرار الغذاء كما يحدث للبطاطس والموز والتفاح...الخ، أو حدوث الجفاف السطحي للأغذية المختلفة.

<u>وتقسم الأغذية من حيث قابليتها للفساد إلى المجموعات التالية:</u>

1- أغذية غير قابله للتلف Shelf stable food (Non-perishable food):

هي الأغذية التي تتميز بمقاومتها لعوامل الفساد المختلفة وبالتالي يمكن حفظها تحت ظروف التخزين العادية لمدة طويلة نسبيا، ومن هذه المواد الحبوب والبقوليات والأغذية الجافة والتوابل والسكر.

2- أغذية متوسطة القابلية للتلف Moderately-perishable food:

هي الأغذية التي يمكن حفظها تحت ظروف الحفظ والتخزين العادية لمدة تتراوح بين بضعة أسابيع وأشهر قليلة، حيث تتميز بانخفاض محتوها المائي، كما يساعد التركيب التشريحي المتمثل بوجود أغلفة سيللوزية سميكة على حمايتها مما يجعلها أقل تعرضا للإصابة بالأحياء المجهرية (كما في بعض أصناف ثمار الفواكه)، كما تعمل الزيوت العطرية لبعض المواد الغذائية كالبصل والثوم كمواد مانعة لنشاط الأحياء المجهرية مما يؤدى إلى إعاقة تأثير عوامل الفساد المختلفة ولكن لمدة أقل من مجموعة الأغذية غير قابله للتلف.

3- أغذية سريعة التلف Highly perishable food:

هي الأغذية التي لا يمكن حفظها تحت الظروف العادية أكثر من بضع ساعات إلى أيام قليلة مثل اللحوم والأسماك وبعض أنواع الخضر والفاكهة ويرجع ذلك إلى كونها بيئة مناسبة لنمو الأحياء المجهرية.

مصادر تلوث الأغذية بالأحياء المجهرية:

العديد من المصادر التي يمكن أن تتسبب في تلوث الأغذية الطازجة أو المصنعة بالأحياء المجهرية والتي قد تتسبب في تلف هذه الأغذية وإلحاق أضرار اقتصادية، أو قد تلحق أضرار صحية بالمستهلكين فيما إذا كانت من الأحياء المجهرية المرضية أو المسببة للتسمم الغذائي.

فالنباتات على سبيل المثال تحمل أنواعاً معينة من الأحياء المجهرية على أسطحها الخارجية، كما قد تتلوث من البيئة المحيطة بها. كما تحمل الحيوانات أنواعاً معينة من الأحياء المجهرية بالإضافة إلى البكتيريا المعوية التي تطرحها مع فضلاتها إلى الخارج. كذلك من البديهي أن الحيوانات المصابة بالأمراض تحمل الأحياء المجهرية (المرضية) المسببة لتلك الأمراض التي تعاني منها. كذلك فإن الأغذية قد تتلوث من مصادر أُخرى أثناء النقل والتداول والتصنيع، وبالتالي فمعرفة المصادر المسببة لتلوث الأغذية بالأحياء المجهرية يمنحنا المعرفة اللازمة للحد من هذا التلوث. وفيما يلي سرد لأهم هذه المصادر المسببة لتلوث الأغذية:

<u>أولاً- التلوث بالأحياء المجهرية من التربة:</u>

تحتوى التربة على أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية أكثر من أي مصدر آخر، وعندما يبحث علماء الأحياء المجهرية عن نوع جديد من هذه الأحياء لغرض ما فإنهم غالبا ما يذهبون إلى التربة. وتحتوى التربة الخصبة على أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية وبأعداد هائلة حيث تلوث أسطح النباتات النامية عليها وأجسام الحيوانات التي تصل إليها. كما يتلوث الغذاء بالغبار المتطاير من التربة نتيجة التيارات الهوائية. ومن الأحياء المجهرية المهمة التي مصدرها التربة أنواع مختلفة من الأعفان والخمائر وبعض البكتيريا مثل الاكتنومايسيتات وبكتيريا الحديد، إضافةً إلى الأجناس البكتيرية التالية.

***Bacillus*, *Clostridium*, *Coliform* Bacteria, *Alcaligenes*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Acetobacter*, *Leuconostoc*, and *Micrococcus*.**

إضافة إلى جراثيم الأعفان ***Aspergillus*** و ***Penicillium*** و ***Mucor*** و ***Fusarium*** وغيرها من الأعفان الأخرى وكذلك جراثيم الخمائر المنتشرة في التربة.

<u>ثانياً- التلوث بالأحياء المجهرية من الهواء:</u>

على الرغم من أن الهواء يعتبر وسط غير صالح لنمو الاحياء المجهرية لعدم توفر قدر كاف من العناصر الغذائية الكافية لنموها إضافة الى تعرضه الى عوامل تؤثر على بقاء الاحياء المجهرية فيه وتكاثرها كأشعة الشمس والتيارات الهوائية والامطار وغيرها لكنه (أي الهواء) يعتبر ناقل للأحياء المجهرية التي تصله من مصادر أخرى كالتربة وتكون أغلبها من الأحياء

المجهرية المترممة كما يحتمل أن يكون الهواء ناقل للأحياء المجهرية المرضية خصوصا تلك التي تسبب عدوى الجهاز التنفسي التي تنتشر من خلال التنفس والسعال والعطاس للأشخاص المرضى، وعلى ذلك يعتبر الهواء من المصادر المهمة لتلوث الغذاء بالأحياء المجهرية، حيث يزداد العدد الكلى للأحياء المجهرية في الغذاء نتيجة تعرضه للهواء، خصوصا إذا كان هذا الهواء ملوثاً بالأحياء المجهرية من التربة وغيرها.

لأجل الحصول منتجات غذائية ذات جودة عالية ولمنع الأحياء المجهرية المسببة للأمراض أو المنتجة للسموم أو تلك المسببة لفساد وتلف منتجات الأغذية من الوصول إلى تلك المنتجات، يجب أن توفر عناية خاصة لمنح التلوث بواسطة الأحياء المجهرية الموجودة في الهواء أثناء التصنيع وبعده. يعتبر العمال هم المصدر الرئيسي لتلوث الهواء بالأحياء المجهرية، إضافةً إلى مواد التعبئة والتغليف. والتهوية الجيدة تزيل الرطوبة التي تنتج أثناء التصنيع ، وبذلك تؤدي إلى حماية المبنى والأجهزة وتمنع تكثف الرطوبة وبالتالي تمنع نمو الفطريات على الأسطح. وقد لوحظ أن التهوية بدون مرشحات تزيد من احتمال التلوث عن طريق الهواء بدرجة كبيرة، لذلك يجب توفير أجهزة تنقية ميكانيكية للهواء (باستخدام المرشحات) في مصانع الأغذية.

وتتكون الأحياء المجهرية للهواء أساسا من الخمائر والأعفان وأنواع متعددة من البكتيريا مثل جنس ***Bacillus*** والبكتيريا الكروية ***Micrococci*** كما يمكن آن يحتوي الهواء أيضا على المكورات العنقودية ***Staphylococcus*** وجنس ***Corynebacterium*** وقد يتلوث الهواء ببكتيريا السالمونيلا ***Salmonella***، وقد يكون السيناريو الأسوأ في صناعة الألبان هو تلوث صالات إنتاج الجبن والألبان المتخمرة بالبكتيريوفاج **Bacteriophages** مما يتسبب في خسائر اقتصادية فادحة. ويتمثل المصدر الرئيسي لتلوث الهواء في وجود عيوب في نظام التهوية ودخول الهواء ونظام الصرف الصحي والعمال. ولخفض المحتوى الميكروبي يجب تنقية الهواء بواسطة مرشحات ذات كفاءة عالية والتي تزيل **90 - 99 %** من الجزيئات ذات حجم واحد ميكرون أو أكبر والمرشحات ذات الكفاءة الفائقة تزيل على الأقل **99.9 %** من جميع الجزيئات ذات الحجم بين **0.1** إلى **2** ميكرون أو أكبر.

ثالثاً- التلوث بالأحياء المجهرية من المياه:

الماء من المصادر الطبيعية المهمة لتلوث الاغذية فهو في احتكاك مباشر مع الاغذية النباتية في الحقل وأثناء عملية الغسيل والتنظيف لهذه المحاصيل أثناء التصنيع، كذلك أثناء شرب وغسل الحيوانات التي ينتج منها الأغذية الحيوانية وكذلك أثناء تصنيع هذه المنتجات الحيوانية، ولا يحتوى الماء على الأحياء المجهرية الموجودة فيه طبيعيا فحسب بل على الأحياء المجهرية من التربة ومن الحيوانات. وتشمل أنواع البكتيريا في المياه على الأجناس التالية:

***Bacillus, Proteus, Achromobacter, Pseudomonas, Alcaligenes, Enterococcus, Chromobacterium, Micrococcus,* and *Coliform* Bacteria.**

ولذلك فالماء المستخدم للشرب ولغسيل الأدوات والأواني المستعملة في إعداد وتداول وتجهيز المواد الغذائية يجب أن يخضع لعدة لفحوصات ميكروبيولوجية قياسية، وأن يكون مقبول من الناحيتين الصحية والاقتصادية. وبصورة عامه فان لأنواع وأعداد الأحياء المجهرية الموجودة في الماء المستعمل للشرب وللمصانع الغذائية أهمية كبرى.

رابعاً- التلوث بالأحياء المجهرية من مياه الصرف الصحي:

تشتمل مياه الصرف الصحي مياه المجاري المختلفة من المنازل والمصانع باختلاف أنواعها. وقد تستعمل مثل هذه المياه (غير المعاملة) لتسميد المزروعات في الحقول، فينتج عن ذلك تلوث المحاصيل النباتية بالأحياء المجهرية المرضية خصوصا التي تصيب الجهاز الهضمي. وبالإضافة إلى البكتيريا المرضية يتم التلوث بالبكتيريا الأُخرى مثل *Coliform* Bacteria, *Enterococcus, Clostridium*. وتنقل المياه الطبيعية الملوثة بمياه المجاري ميكروباتها إلى الأسماك والحيوانات المائية الأُخرى. وتضيف مياه المجاري المعاملة المضافة للتربة أو الأنهار عدد من الأحياء المجهرية وبعض البكتيريا المرضية (والتي قد توجد في حال كانت المعاملة لهذه المياه غير كافية).

خامساً- التلوث بالأحياء المجهرية من النباتات:

تختلف الأحياء المجهرية الموجودة طبيعيا على أسطح النباتات من نبات لآخر، ولكن في معظم الأحيان تحتوى على الخمائر والأعفان إضافةً إلى الأجناس البكتيرية التالية:

***Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Achromobacter, Micrococcus, Coliform, Lactobacillus, Leuconostoc, Enterococcus,* and *Bacillus*.**

ويعتمد عدد البكتيريا على نوع النبات وطبيعة المحيط الذي تعيش فيه هذه الأحياء، فتتراوح أعدادها من مئات قليلة إلى عدة ملاين بالسنتمتر المربع الواحد من سطح النبات، فمثلاً يحتوى السطح الخارجي للطماطم المغسولة جيدا بضعة مئات من الخلايا البكتيرية بالسنتيمتر المربع الواحد، بينما تحتوى الطماطم غير المغسولة على عدة آلاف منها، كما تحتوى الأوراق الخارجية للملفوف Cabbage غير المغسولة على 1 – 2 مليون خلية بكتيرية بالجرام الواحد، بينما تحتوى الأوراق الخارجية المغسولة له على 200 – 500 ألف خلية بكتيرية بالجرام الواحد.

كما أن الأجزاء الخارجية من النباتات تتلوث من التربة والماء مياه المجاري ومن الحيوانات ومخلفاتها وبالتالي تضاف أنواع جديدة من الأحياء المجهرية إلى الحمولة الميكروبية لهذه النباتات. وليست الأسطح والأجزاء الخارجية من النباتات فقط هي التي تحمل تلك الأحياء

المجهرية، ولكن وجد بان بعض الفواكه تحتوى على أحياء مجهرية في الجزء الداخلي منها.

سادساً- التلوث بالأحياء المجهرية من الحيوانات:

لا تعتبر الأحياء المجهرية الموجودة على أسطح اللحوم ذات أهمية كبرى مقارنة بالأحياء المجهرية الموجودة في جهازها الهضمي، كذلك فإن الأحياء المجهرية المجودة على جلود وحوافر وشعر هذه الحيوانات تشكل مصدر مهم من مصادر تلوث الأغذية الحيوانية المصنعة.

والحيوانات لا تحتوى على أعداد كبيرة من الأحياء المجهرية للتربة والروث فحسب بل تحتوى أيضاً على أنواع مهمة من الأحياء المجهرية المسببة المتلف. فالدواجن تحتوي في أرجلها وريشها على أحياء المجهرية كثيرة من مصادر مختلفة، وغالباً ما تأتى البكتيريا المرضية القادرة على إحداث المرض للإنسان في معظم الأحيان من مصدر حيواني، فمثلا بكتيريا ***Salmonella*** غالباً ما تأتى من الدواجن واللحوم.

وتضيف الحيوانات أنواع من الأحياء المجهرية إلى التربة والماء والنباتات عن طريق إفرازاتها وفضلاتها ومن أهم هذه الأحياء المجهرية الأجناس البكتيرية التالية:

Alcaligenes, Coliform Bacteria, Enterococcus, Clostridium, Lactobacillus, Bifidobacterium, Propionibacterium, Micrococcus, **and** ***Bacillus*****.**

كما أن الحيوانات أيضاً تتسبب في التلوث المباشر منها إلى المواد الغذائية النباتية، فعلى سبيل المثال تسبب الطيور والحشرات تلفاً ميكانيكياً للفواكه والخضروات وهى بذلك تعمل على تلويثها بالأحياء المجهرية من ناحية كما تفتح الطريق لغزو مختلف الأحياء المجهرية للأنسجة الداخلية لهذه الفواكه والخضروات من ناحية أُخرى مسببة سرعة تلفها.

وتعتبر الأنسجة الداخلية للحيوانات (العضلات واللحم) السليمة، خالية عن البكتيريا المرضية، ولكن عند الذبح هنأك عوامل تسبب هذه الأنسجة والدم بالذات، فالسكين وسيله للتلوث ونقل الأحياء المجهرية، وخصوصا عند إزالة الأحشاء الداخلية المحتوية على البكتيريا المعوية، حيث تتلوث بهذه الأحياء المجهرية وتسهم في تلويث الذبيحة بها أثناء التقطيع.

ومن أهم أنواع البكتيريا التي تسبب تلوث أو فساد اللحم وخصوصا المحفوظ بالتبريد هي المحبة لدرجات الحرارة المنخفضة **Psychrophilic** وبعض أنواع الأعفان، وتشمل البكتيريا المحبة لدرجات الحرارة المنخفضة على الأجناس التالية: ***Pseudomonas*** و ***Alcaligenes*** و ***Flavobacterium***. أما أنواع الأعفان التي تنمو في درجات الحرارة المنخفضة فهي: ***Mucor*** و ***Rhizopus*** و ***Thamnidium***. أما البكتيريا المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة **Mesophilic** والتي تنمو في درجة حرارة الغرفة فقليلة التأثير على تفسخ وفساد اللحوم.

سابعاً- التلوث بالأحياء المجهرية أثناء تداول وتصنيع الأغذية:

تشكل الأسطح التي تلامس الغذاء مباشرة التي تشمل منصات وأدوات التقطيع وأدوات التقديم كالأطباق والأكواب وغيرها، مصدراً لتلوث الأغذية وخصوصاً عند عدم الاعتناء بنظافتها أو عند احتواء أسطحها على خدوش أو شروخ تعمل على إيواء الأحياء المجهرية. كما أن العاملون في تصنيع وتداول الأغذية يعتبروا من المصادر المسببة للتلوث الغذائي، حيث تكون الأحياء المجهرية موجودة في أيديهم وملابسهم كما أن تجاويف الأنف والفم تحتوي على بعض أجناس البكتيريا مثل *Staphylococcus*، كما قد يحتوى الجهاز الهضمي لبعض العاملين في مجال تصنيع وتداول الأغذية على بكتيريا *Salmonella* و *Shigella* المرضية، وبالتالي فمن الممكن تلوث الأغذية بعض البكتيريا المرضية عن طريق العادات السيئة مثل العطس أو السعال أو عدم غسل الأيدي والاعتناء بالنظافة الشخصية بعد استعمال دورات المياه، ومن أمثلة الأمراض التي تنقل من الإنسان المصاب أو الحامل للميكروب عن طريق الحليب حمى التيفوئيد Typhoid والخناق Diphtheria والحمى القرمزية Scarlet Fever والتهاب الحلق Sore throat.

إن الحديث حول بعض مصادر التلوث مثل التربة والمياه ومياه الصرف الصحي يطول ويمكن للطالب الاستزادة بالمعلومات بالعودة إلى مقرري ميكروبيولوجيا التربة وميكروبيولوجيا المياه والمجاري.

العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية في الأغذية:

هناك عدد من العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية في الأغذية، فنموها في الأغذية يعتمد على توفر احتياجاتها من العناصر المغذية التي تساعدها على القيام بعملياتها الحيوية لتوليد الطاقة التي تحتاجها أو بناء مكوناتها الخلوية، كذلك الرطوبة الملائمة إضافة إلى توفر الأس الهيدروجيني الملائم ومدى مناسب من جهد الأكسدة والاختزال في الغذاء. ولكل عامل من هذه العوامل له تأثيره على نمو الأحياء المجهرية في الأغذية، إلا أن جميع هذه العوامل تتكامل معاً في تحديد نوعية الأحياء المجهرية النامية في الأغذية المختلفة، فقد يكون محتوى الغذاء من العناصر المغذية ملائم لمجاميع متنوعة من الأحياء المجهرية إلا أنه قد تكون درجة حرارة حفظ هذا الغذاء أو الأس الهيدروجيني أو جهد الأكسدة والاختزال غير ملائم لعدد من تلك المجاميع، فبالتالي فإن هذا التداخل بين تلك العوامل يحدد أنواع الأحياء المجهرية الممكن تواجدها في هذا الغذاء.

1- محتوى الغذاء من العناصر المغذية Nutrient Content:

تقسم الأحياء المجهرية من ناحية احتياجاتها الغذائية إلى قسمين رئيسين هما: الأحياء المجهرية ذاتية التغذية التي تستخدم ثاني أكسيد الكربون CO_2 كمصدر وحيد للكربون ويمكنها أن تنمو وتتكاثر على بيئات غير عضوية، وبالتالي فان هذا النوع من الأحياء المجهرية لا تشكل أي مشاكل بالنسبة للأغذية وهي كذلك لا تسبب أمراضاً للإنسان.

أما النوع الثاني فهي الأحياء المجهرية غير ذاتية التغذية (وهي التي تهمنا بالنسبة لدراسة الأحياء المجهرية في الأغذية) تتطلب مصدراً عضوياً للكربون ومصادر عضوية أو غير عضوية للنتروجين إضافة إلى الفيتامينات وعوامل النمو الأخرى وعدد من العناصر المعدنية. وبالطبع فإن هناك عدد كبير جداً الأغذية تعتبر بيئة ملائمة توفر احتياجات الأحياء المجهرية من الكربوهيدرات والبروتينات والدهون وكذلك الفيتامينات وعوامل النمو الأخرى إضافة الأملاح المعدنية والتي تعتبر من العوامل المساعدة في إتمام العمليات الحيوية العديدة في الأحياء المجهرية.

وتحتوى عدد من الأغذية على مصادر الكربون العضوية مثل السكريات الأحادية والثنائية والمتعددة وهي من أفضل المصادر الكربونية للأحياء المجهرية والتي تقوم بتحليل السكريات الثنائية والمتعددة إلى سكريات أحادية ومن ثم أكسدتها إلى CO_2 والماء (في الظروف الهوائية) أو تخمر هذه السكريات لاهوائياً إلى كحولات أو أحماض عضوية، وهذه المواد قد تستخدم من بعض الأحياء المجهرية كمصادر كربونية بحيث تُأكسد هذه المواد أكسدة كاملة إلى CO_2 والماء أو جزيئاً إلى مركبات أصغر وبالتالي احداث تغيرات غير مرغوبة في تلك الأغذية التي تنمو فيها هذه الأحياء المجهرية. كما يمكن لبعض الأحياء المجهرية استخدام الدهون كمصادر للكربون والطاقة فتتحلل إلى أحماض دهنية وجليسرول.

وتستخدم الأحياء المجهرية النتروجين من مصادر عضوية كالبروتينات من قِبل الأحياء المجهرية المحللة للبروتين وهنا تحلل بروتينات الغذاء إلى ببتيدات عديدة، وأحماض أمينية، وأمونيا أو أمينات **Amines** إضافة إلى كبريتيد الهيدروجين H_2S وثاني أوكسيد الكربون CO_2، كما قد تستخدم بعض الأحياء المجهرية ونواتج تحلل البروتينات مثل البروتيوزببتون والببتون والببتيدات والأحماض الأمينية واليوريا والأمونيا كمصادر للنتروجين، كما يمكن لبعض الأحياء المجهرية استخدام مصادر النتروجين غير عضوية مثل أملاح الامونيوم والنترات.

ويتفاوت محتوى الأغذية المختلفة من الفيتامينات والعناصر المعدنية وعوامل النمو المختلفة، كما تتفاوت احتياجات الأحياء المجهرية من تلك الفيتامينات والعناصر المعدنية وعوامل النمو المختلفة، وبالتالي يودى ذلك إلى تنوع مجاميع الأحياء المجهرية التي يمكن أن تنمو في كل نوع من الأغذية. إن فعالية الأحياء المجهرية الموجودة في الأغذية المختلفة تحدث مجموعة من التغيرات الكيميائية والحسية لمكونات الغذاء مما يتسبب في تغيرات غير مرغوبة (فساد تلك الأغذية) أو تغيرات مرغوبة (تصنيع أغذية جديدة).

2- المحتوى المائي والنشاط المائي Moisture Content & Water Activity:

يلزم وجود الماء لنمو الأحياء المجهرية حيث يعمل كوسط تذوب فيه المواد الغذائية الداخلة إلى الخلية وكذلك المواد الخارجة منها كما أنه يدخل في التفاعلات الحيوية الخاصة بالخلايا الميكروبية، وللتعبير عن كمية الماء في الأغذية نستخدم مصطلحين الأول هو محتوى الأغذية من الرطوبة (المحتوى المائي) ويتم حسابه من خلال المعادلة التالية:

$$\text{نسبة الرطوبة } \% = \frac{\text{وزن عينة الغذاء قبل التجفيف - وزن عينة الغذاء بعد التجفيف}}{\text{وزن عينة الغذاء قبل التجفيف}} \times 100$$

أما المصطلح الأخر فهو فعالية الماء أو النشاط المائي **Water Activity** (a_w) فيطلق لمعرفة مدى تيسر الماء للأحياء المجهرية (كمية الماء اللازمة لنمو الأحياء المجهرية)، ويقصد به هيئة تواجد الماء في المنتج بصورة حرة متاحة للأحياء المجهرية (ولا نقصد بها نسبة الرطوبة % بمعناها المذكور سابقاً)، فإضافة إلى الماء الحر المتاح للأحياء المجهرية هناك أيضاً الماء المرتبط مع الغذاء أسموزياً، وهناك كذلك نوع ثالث من الماء هو الماء المرتبط كيميائياً وهو ما لا يمكن نزعه من المادة الغذائية إلا بتحطيم تلك الروابط الكيميائية بعملية الترميد.

والنشاط المائي **Water Activity** (a_w) مؤشر مهم للتعرف على سرعة تلف الغذاء ويتم حسابه وفقاً للنسبة بين ضغط بخار الماء للمادة الغذائية وضغط البخار للماء النقي على نفس درجة الحرارة، ويستخدم لذلك جهاز يسمى مُحَلِّل النشاط المائي **Water activity analyzer**، ويتراوح قيم النشاط المائي a_w بين صفر و واحد صحيح، ففي الأغذية الطازجة يقترب النشاط المائي فيها من الواحد الصحيح وبالتالي يسهل فسادها بسبب سرعة نمو الأحياء المجهرية فيها بعكس الأغذية الجافة التي ينخفض فيها النشاط المائي إلى حدود لا تسمح بنمو الأحياء المجهرية.

جدول رقم (8): قيم الحَدودّ الدنيا التقريبيُة للنشاط المائي (a_w) لنمو بعض الأحياء المجهرية *

مجاميع الأحياء المجهرية	النشاط المائي	الكائن المجهري	النشاط المائي a_w
معظم البكتيريا المسببة للفساد	0.90	*Escherichia coli*	0.96
معظم الخمائر المسببة للفساد	0.88	*Bacillus subtilis*	0.95
معظم الأعفان المسببة للفساد	0.80	*Staphylococcus aureus*	0.86
البكتيريا المحبة للملوحة	0.75	*Eurotium repens*	0.72
الخمائر المحبة للضغط الأسموزي	0.62	*Zygosaccharomyces rouxii*	0.62
الأعفان المحبة للجفاف	0.61	*Xeromyces bisporus*	0.61

* المصدر (Jay *et al.*, 2005).

وكون الغشاء السيتوبلازمي للخلايا يجب أن يكون محاطاً بالماء الحر باستمرار قدر الامكان فعليه تنخفض الخواص الوظيفية بانخفاض قيم النشاط المائي a_w عن القيم المثلى لكل كائن مجهري وبالتالي يحدث زيادة في الفترة الزمنية التي يستغرقها الطور التمهيدي مع نقص معدل النمو وقلة حجم الخلايا أثناء أطوار النمو كله نتيجة حدوث نقص واضح في كميات العناصر المغذية التي تستطيع الخلية امتصاصها بداخلها، ويتطور ذلك إلى حدوث حالات جفاف للمحتويات الداخلية للخلايا عند بقائها لفترات زمنية طويلة في وسط خارجي يمتاز بقيم نشاط مائي a_w منخفضة، ويرجع ذلك لاختلال التوازن الاسموزي بين تلك المحتويات الداخلية والوسط الخارجي.

3- درجات حرارة الحفظ والتخزين للغذاء Storage Temperature:

عرفنا سابقاً أن لكل نوع من الأحياء المجهرية درجة حرارة مثلى يكون عندها النمو عند أقصى حد وسبق تقسيم الأحياء المجهرية تبعا لذلك إلى الأقسام التالية:

أ- الأحياء المجهرية المتحملة و المحبة للبرودة Psychrotrophic and Psychrophilic:

تعرف الأحياء المجهرية المتحملة للبرودة **Psychrotrophic** بأنها تلك الكائنات التي تستطيع النمو بشكل لا بأس به عند درجات حرارة التبريد التجارية من 2 - 7°م بغض النظر عن درجة نموها المثلى، أما الأحياء المجهرية المحبة للبرودة **Psychrophilic** فهي تلك الأحياء المجهرية التي تكون درجة حرارة نموها المثلى أقل من 20°م، وبالتالي فإن هذه المجموعة من الأحياء المجهرية تتسبب في فساد الأغذية المحفوظة في درجات الحرارة المنخفضة مثل اللحوم والدواجن والأسماك ومنتجات الألبان.

ب- الأحياء المجهرية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Microorganisms:

تشمل هذه الأنواع جميع الأحياء المجهرية المرضية Pathogenic Microorganisms ونسبة كبيرة من الأحياء المجهرية غير المرضية. ودرجة الحرارة المثلى لنموها 30 - 40°م وبمدى 12 - 45°م، وتتسبب مجاميع من هذه الأحياء المجهرية في حدوث التسمم الغذائي وكذلك فساد مجموعة كبيرة من الأغذية سواء الخام أو المصنعة.

ج- الأحياء المجهرية المقاومة للحرارة والمحبة لدرجة الحرارة العالية Thermoduric & Thermophilic Microorganisms:

الأحياء المجهرية المقاومة للحرارة هي الأحياء المجهرية التي تقاوم درجات أعلى من الدرجة القصوى لنموها. أما الأحياء المجهرية المحبة لدرجة الحرارة العالية فهي الأحياء المجهرية التي تكون درجة الحرارة المثلى لنموها فوق 50°م، وهذه المجموعة من الأحياء المجهرية تتسبب في فساد الأغذية المعلبة.

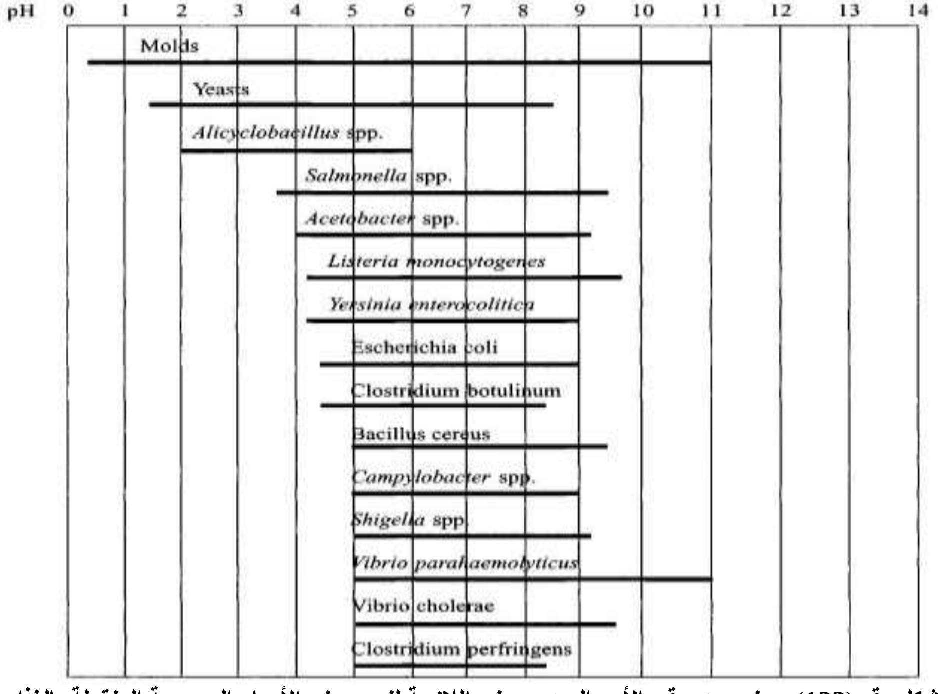
وبناء على ذلك فإن درجة الحرارة التي يحفظ عندها الغذاء تحدد طبيعة وأعداد الأحياء المجهرية التي تنمو فيه، فحفظ الغذاء عند درجات حرارة منخفضة يؤدي إلى نتيجة انخفاض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو مما يتسبب بتقليل النشاط الأيضي للأحياء المجهرية بسرعة بسبب انخفاض معدل سرعة التفاعلات الكيمائية الحيوية، وزيادة لزوجة السوائل الخلوية، وتصلب ليبيدات الغشاء الخلوي، وإذا استمر هذا الانخفاض بشكل كبير فيتوقف النمو الخلوي تماماً، أما عند ارتفاع درجة الحرارة عن الدرجة المثلى للنمو فترتفع سرعة العمليات الايضية وسرعة النمو، بعدها تبدأ سرعة العمليات الايضية في الانخفاض وذلك بسبب تأثر المكونات الحساسة للحرارة في الخلية البكتيرية فيقل النمو الى أن يصل إلى أضعف ما يمكن وذلك عند درجة الحرارة القصوى حيث يحدث عندها دنترة للبروتينات الخلوية، لكن قد تودي تحسن الظروف إلى حدوث تعويض البروتينات المتضررة وخصوصاً كونها من للبروتينات الخلوية وليست من البروتينات الوظيفية وبالتالي تعاود الخلية النمو إذا ما عادت درجة الحرارة إلى المعدلات المثلى للنمو، لكن إذا ما جاوزت درجة الحرارة الدرجة القصوى للنمو (أعلى درجة حرارة تستطيع الأحياء المجهرية ان تنمو عندها) فإن النمو الخلوي يتوقف وتموت الخلية.

4- الأس الهيدروجيني pH:

يعد أيون الهيدروجين مهماً في العمليات الحيوية التي تحدث في الخلية، وبالتالي فإن تأثير الأس الهيدروجيني على الأحياء المجهرية يكون نتيجة التأثير على الإنزيمات والتأثير على نقل العناصر الغذائية عبر الغشاء السيتوبلازمي الذي يعتبر غير منفذ نسبياً لأيونات الهيدروجين أو

أيونات الهيدروكسيل، لذلك فتركيز هذه الأيونات يبقى ثابت نسبياً داخل الخلية حتى مع تغير pH البيئة المحيطة. إن الأس الهيدروجيني لمعظم الأحياء المجهرية يقترب من التعادل، وعند تغير طبيعة الوسط الذي تنمو فيه هذه الأحياء المجهرية نحو الحامضية، فلكي تستمر في النمو لابد وأن تستطيع أن تمنع دخول أيونات الهيدروجين أو تستطيع ضخها إلى الخارج إذا دخلت الخلية، فإذا حدث انخفاض pH للوسط يظل pH للخلية ثابتاً نتيجة إخراج البروتونات إلى خارج الخلية مما ينشأ عنه تدرج في الـpH (pH gradient) على جانبي غشاء الخلية. ومن اجل إخراج البروتونات من الخلية فإنها تستهلك طاقة على صورة ATP، وفى نهاية الطور اللوغاريتمي فإن كمية الـ ATP المتاحة لا تكون كافية ويتبع ذلك اختفاء تدرج الـpH ويعمل ذلك على تثبيط النشاط الإنزيمي وبالتالي تثبيط نمو الأحياء المجهرية.

وتختلف الاغذية فيما بينها من حيث قيمة الأس الهيدروجيني لها، فهناك أغذية حامضية وأخرى شديدة الحموضة وأغذية متعادلة وأغذية ذات طبيعة قاعدية، كما تختلف مقدرة الأحياء المجهرية المختلفة على النمو باختلاف رقم الأس الهيدروجيني فمن المعروف أن غالبية مجاميع البكتيريا تفضل الوسط المتعادل، بينما تنمو الخمائر والأعفان في مدى واسع من الأس الهيدروجيني مع تفضيلها للنمو في الوسط الحامضي.



الشكل رقم (123) يوضح مدى قيم الأس الهيدروجيني اللازمة لنمو بعض الأحياء المجهرية المنقولة بالغذاء، الأس الهيدروجيني لكل من *L. monocytogenes* و *S. aureus* متماثل، عن (Jay *et al.*, 2005).

ويمكننا تقسيم الأغذية حسب قيم الأس الهيدروجيني لها إلى المجاميع التالية:

أ- الأغذية ذات الطبيعة المتعادلة:

قيمة الأس الهيدروجيني لهذه الأغذية بين 6.5 – 7.0، مثل اللحوم والدواجن ومنتجات الألبان، وتتسبب البكتيريا بشكل رئيس في تلف هذه الأغذية مع إمكانية تلفها بواسطة مجموعة واسعة من الأعفان والخمائر.

ب- الأغذية ذات الطبيعة الحامضية:

وتقسم هذه الأغذية إلى أربع مجاميع فرعية هي: - الأغذية قليلة الحموضة: ويتراوح قيمة الأس الهيدروجيني لها بين 5.3 – 6.5، مثل بعض اللحوم والاسماك والتي يمكن أن تتلف بواسطة مجاميع متنوعة من البكتيريا والأعفان والخمائر، - الأغذية متوسطة الحموضة: ويتراوح قيمة الأس الهيدروجيني لها بين 4.5 – 5.3، مثل الفواكه والخضروات الطازجة وبعض الأغذية المعلبة، وتتلف بواسطة البكتيريا المحبة للحموضة والأعفان والخمائر، - الأغذية الحامضية: ويتراوح قيمة الأس الهيدروجيني لها بين 3.7 – 4.5، مثل الالبان المتخمرة وعصائر الفاكهة، وتتلف ايضاً بواسطة البكتيريا المحبة للحموضة والأعفان والخمائر، - الأغذية شديدة الحموضة: وقيمة الأس الهيدروجيني لها أقل من 3.7، مثل المخللات والبُرْقُوق (الخَوْخ) وعصائر البرتقال والليمون، وعلى الرغم من كونها نادرة التلف إلا أنها قد تتلف بواسطة الأعفان والخمائر.

ج- الأغذية ذات الطبيعة القاعدية:

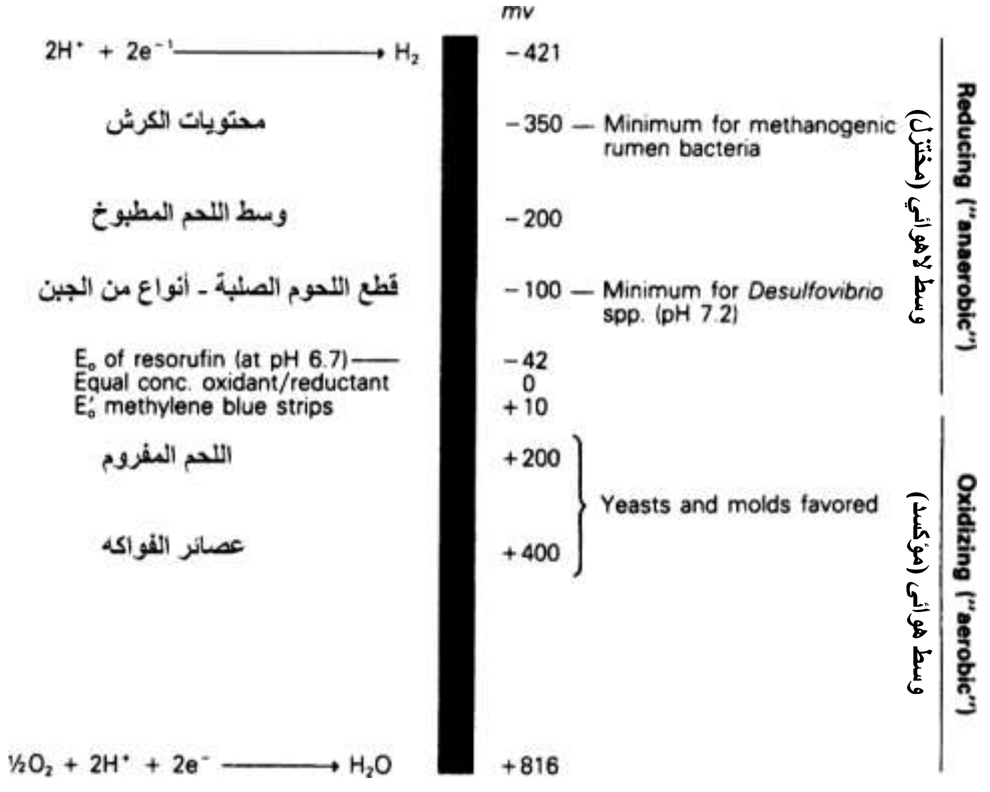
يكون قيمة الأس الهيدروجيني للأغذية ذات الطبيعة القاعدية (على الرغم من قلتها) أعلى من 7 ومن أمثلتها بياض البيض الذي يبلغ قيمة الأس الهيدروجيني له 9.6 وكذلك بعض الخضروات، وبالتالي فإن فساد هذه الأغذية يكون بسبب البكتيريا المحبة أو المتحملة للقلوية Alkaliphiles & Alkalitolerant مثل *Achromobacter* و *Proteus* و *Pseudomonas*.

وللأس الهيدروجيني للغذاء تأثير كبير على درجة مقاومة أبواغ (جراثيم) البكتيريا المتجرثمة للحرارة، ففي الأغذية ذات الأس الهيدروجيني المتعادل تكون مقاومة الأبواغ البكتيرية للحرارة في حدها الأقصى، أما في الأغذية الحامضية التي يقل فيها الأس الهيدروجيني عن 5 فتقل مقاومة الأبواغ البكتيرية للحرارة كثيراً وتحتاج إلى وقت قليل لإبادتها وقد تمت الاستفادة من هذه الخاصية الأخيرة في تعقيم بعض الخضروات التي تتأثر بالدرجات الحرارية العالية عند تعقيمها فبهذه الحالة يتم إضافة حامض للمحلول الملحي المعبأ في هذه العلب من أجل خفض مقاومة هذه الكائنات الحية والقضاء عليها في درجات حرارة أقل من تلك المستخدمة قبل إضافة ذلك الحامض.

5- جهد الأكسدة والاختزال Oxidation-Reduction Potential:

عند استعراضنا سابقاً لعلاقة الأحياء المجهرية بالأكسجين اتضح لنا أنه يمكن تقسيمها إلى خمس مجموعات وهي الأحياء الهوائية اجباراً **Obligate Aerobes**، واللاهوائية اجباراً **Obligate Anaerobes** واللاهوائية اختيارياً **Facultative Anaerobes**، وتلك المحبة لكميات قليلة من الهواء **Microaerophiles** وأخيراً تلك المتحملة للهواء **Aerotolerant**.

ويقاس توفر الأكسجين من عدمه في أي وسط ما من خلال قياس جهد الأكسدة والاختزال في هذا الوسط باستخدام الأقطاب الكهربائية أو الصبغات مثل صبغة أزرق المثيلين التي تحتفظ بلونها الأزرق في الوسط الهوائي (المؤكسد) بينما تفقد لونها وتصبح عديمة اللون في الوسط اللاهوائي (المختزل)، ويعرف جهد الاكسدة والاختزال بقدرة المادة على فقد او اكتساب الالكترونات، فتعرف المادة التي تفقد الإلكترونات بأنها مادة قابلة للأكسدة حيث يحدث فقد للإلكترونات في البيئة المحتوية على الأكسجين، بينما تعرف المادة التي تكتسب الالكترونات بأنها مادة قابلة للاختزال حيث يحدث اكتساب للإلكترونات في البيئة المختزلة (اللاهوائية).



الشكل رقم (124) مخطط تمثيلي لجهد الأكسدة والاختزال لبعض الأغذية وعلاقته بنمو بعض مجاميع الأحياء المجهرية، عن (Jay *et al.*, 2005).

6- محتوى الغذاء من المواد المضادة للميكروبات Antimicrobial Constituents:

تحتوي بعض الأغذية طبيعياً على مواد مضادة للأحياء المجهرية تحد من نمو هذه الأحياء المجهرية في تلك الأغذية، ومن أمثلة هذه الأغذية التوابل التي تحتوي على بعض الزيوت العطرية التي لها خواص مضادة للميكروبات كما يحتوي التوت البري على مركب Benzoic acid وبياض البيض الذي يحتوي على إنزيم اللايسوزيم Lysozyme والحليب الطازج يحتوي على أنظمة متعددة مضادة للنمو الميكروبي منها اللاكتوفيرين Lactoferrin.............الخ.

7- وجود ونشاط الأحياء المجهرية الأُخرى في الغذاء Presence and Activities of Other Microorganisms:

يتأثر النشاط الميكروبي في الأغذية نتيجة فعالية ونشاط أنواع معينة من الأحياء المجهرية والتي عادة ما تتواجد في الأغذية بصورة مختلطة، ونادراً ما توجد بصورة نقية. أن العلاقة بين أنواع الأحياء المجهرية في الأغذية أما أن تكون علاقة تضاد Antagonism وفي هذا النوع من العلاقات ينمو نوعين أو أكثر من الميكروبات مع بعضها وينتج عن نشاط احد هذه الأنواع وقف نشاط الميكروب الأخر الذي يعيش معه نتيجة تغير في ظروف البيئة كتغير الأس الهيدروجيني أو نقص المواد الغذائية أو تكوين سموم لأنواع الميكروبات الأخرى. أو علاقة تكافل Synergism وفي هذا النوع من العلاقات يكون على أساس تعاون بين نوعين أو أكثر من الميكروبات بحيث يكون الناتج عن هذا التعاون اكبر من إنتاج كل ميكروب على حده، أو يقوم كل نوع بأحداث تغيرات لا يستطيع أن يقوم بها إذا ما نمى بمفرده، كما يحدث في البادئات المختلطة كبادئ الزبد. كذلك علاقة تبادل المنفعة Symbiosis وهذا النوع من العلاقات يكون عند ما يعيش كائنين أو أكثر مع بعضهما و ينتج عن هذه المعايشة استفادة كل من هذه الكائنات نتيجة لنشاط كل منها كما يحدث في بادئ الزبادي. وقد تكون العلاقة بين الأحياء المجهرية علاقة المنفعة من جهة واحدة Commensalisms وفي هذا النوع من العلاقات يستفيد احد الأنواع الميكروبية من نشاط باقي الأنواع الأُخرى، كما هو الحال عند نمو الأحياء المجهرية الهوائية في غذاء معين فإنها تستهلك الأوكسجين وحينذاك تسمح للأحياء المجهرية اللاهوائية بالنمو عند توفر الظروف اللاهوائية.

8- عوامل أُخرى:

هناك عوامل أُخرى تؤثر على نمو الأحياء المجهرية في الأغذية مثل بقايا المضادات الحيوية ومتبقيات الأدوية البيطرية الأُخرى المستخدمة في علاج الحيوانات وكذلك متبقيات المبيدات المستخدمة في وقاية النباتات من الآفات وهذه المبيدات أيضاً التي قد تنتقل إلى الحيوانات من الحشائش والأعشاب التي ترعى منها هذه الحيوانات، وكل هذه العوامل تؤثر على نمو الأحياء المجهرية في الأغذية (وما يهمنا هنا تلك الأحياء المجهرية المستخدمة كبادئات في صناعة الأغذية المتخمرة).

حفظ الأغذية Food Preservation:

من خلال التعريف الذي ذُكر في بداية هذا الكتاب عن ميكروبيولوجيا الأغذية خلُصنا إلى أنه من خلال دراسة هذا العلم لمظاهر الفساد في الأغذية أمكن استخدام وسائل معينة لحفظ الأغذية والسيطرة على نمو الأحياء المجهرية فيها بوسائل مختلفة مثل الحرارة (سواءً العالية أو المنخفضة) أو التجفيف أو التخمر أو إضافة بعض المواد الكيميائية مما يسهم في حفظ الأغذية المختلفة وتوفرها لأوقات أو مواسم يقل فيها إنتاج هذه الأغذية. وكما سبقت الإشارة إلى أن المتخصص في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية بالإضافة إلى إلمامه بعلم الأحياء المجهرية، يجب أن يُلم بعلوم كيمياء وتحليل الأغذية وطرق وتقنيات حفظ الأغذية إضافة إلى عمليات التصنيع الغذائي.

ونهدف في عمليات حفظ الأغذية إلى إطالة فترة بقاء الغذاء صالحاً لأطول فترة ممكنة، باستخدام مختلف الوسائل العلمية كافة بالطرق الصحيحة بهدف منع الفساد الطبيعي للأغذية بالسيطرة على الأحياء المجهرية في الأغذية من خلال: (1) تقليل أو منع وصول الأحياء المجهرية إلى الغذاء، (2) إزالة الأحياء المجهرية من الغذاء، (3) تأخير وإعاقة نمو الأحياء المجهرية في الغذاء، (4) قتل وإبادة الأحياء المجهرية في الغذاء، بحيث تحدد خواص المادة الغذائية الطبيعية والكيمائية والغذائية الطريقة الأمثل لحفظها، ويجب أن يراعى في تلك الطرق أن لا تتسبب بإحداث أي تأثير سلبي على القيمة الغذائية للمنتج النهائي.

1- تقليل أو منع وصول الأحياء المجهرية إلى الغذاء:

تتعرض الأغذية المختلفة في جميع مراحل تداولها Handing (الإنتاج والتجميع والتخزين والنقل والعرض والتجهيز والتقديم) للتلوث بالأحياء المجهرية، ولذلك ينبغي أن نحرص على تقليل وصول الأحياء المجهرية للأغذية (لأن منعها قد يكون مستحيل) من خلال اتخاذ مجموعة من التدابير الكفيلة بالحد من تلوث الأغذية أو البيئة المحيطة التي يتم فيها تداول وانتاج الغذاء، والأساس في هذه التدابير والإجراءات تكمن في معرفة دور الأحياء المجهرية في مجال الشؤون الصحية لمنشآت تصنيع وتداول الأغذية وطرق الحد من نموها، وكذلك معرفة الاشتراطات الصحية للعاملين في مجال الأغذية والاشتراطات الصحية لمنشآت تصنيع وتداول الأغذية واستخدام طرق التنظيف والتطهير الملائمة للمعدات والأجهزة والأدوات المستخدمة فيها وتطبيق جميع الإجراءات الضرورية لضمان جودة وسلامة Safety الأغذية في جميع مراحل تداولها، والتخلص الأمثل لمخلفات ونفايات هذه المنشآت، وتطبيق صارم لبرنامج مراقبة جودة الغذاء واختبار الشؤون الصحية Hygiene لمصانع ومعامل الأغذية ومراقبة الحالة الميكروبيولوجية للمعدات والأجهزة والأدوات التي تكون على تماس مباشر مع الغذاء (اختبارات النظافة Sanitation test).

وقد وضعت مواصفات مرجعية للمنتج النهائي تتضمن بعض المعايير التي تضمن سلامة وجودة الغذاء، كما وضعت اشتراطات صحية لتداول الغذاء، وقواعد للممارسات الصحيحة لتصنيع الغذاء Good Manufacturing Practices (GMP)، وتطبيق نظام تحليل المخاطر ونقاط التحكم الحرجة The Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)، حيث يتم تحليل مصادر الخطر سواء في الغذاء نفسه أو في المراحل المختلفة لتداوله، ومن ثم تحديد النقاط الحرجة خلال مراحل تداول الغذاء المختلفة، ومن ثم مراقبة هذه النقاط ومتابعتها من خلال برنامج يتم تبنية لضمان التحكم بتلك النقاط.

2- إزالة الأحياء المجهرية من الغذاء:

عرفنا في الفصل السابق أن العديد من المصادر التي يمكن أن تتسبب في تلوث الأغذية بالأحياء المجهرية، ومن تلك المصادر التربة والهواء والمياه وغيرها، وتتم إزالة الأحياء المجهرية من الأغذية التي تلوثها من خلال عمليات تصنيعية تتضمن عملية نقع الأغذية الخام في الماء أو الماء المضاف إليه مواد مطهرة مثل الكلور بنسبة 15 – 25 جزء في المليون مما يسهم في إزالة جزء من مصادر التلوث تلك، كذلك عملية الغسيل التي تلي عملية النقع بواسطة التقليب Agitation أو الرش برذاذ من الماء تحت ضغط معين على مسافة معينة Spray Washing، تتبعها عملية الفرز Sorting حيث تمرر الأغذية الخام على سيور ناقلة فيقوم العمال باستبعاد الأجزاء غير الصالحة للتعبئة أو غير تامة النضج أو المصابة بالحشرات أو الفطريات. أما الأغذية السائلة فيتم إزالة الأحياء المجهرية منها بعمليات الترسيب والترشيح والطرد المركزي.

3- تأخير وإعاقة نمو الأحياء المجهرية في الغذاء:

تعتمد معظم طرق الحفظ على تأخير وإعاقة نمو الأحياء المجهرية في الغذاء من خلال:

(1) استخدام درجات الحرارة المنخفضة والتي تكون قريبة من الصفر المئوي (3 – 5°م) أو أقل من الصفر المئوي (-18°م أو -32°م)، فكما عرفنا سابقاً أن انخفاض درجة الحرارة يؤدي إلى بطء نشاط الأحياء المجهرية وإنزيمات الغذاء وكذلك إبطاء التغيرات الحيوية الأخرى التي تحدث في الغذاء مؤدية إلى تدهور صفاته سريعاً. ومن المعروف أنه كلما انخفضت درجة حرارة الغذاء كلما طالت الفترة الممكن تخزين الغذاء عليها وذلك في حدود معينة حسب نوع الغذاء وبحيث لا تبلغ درجة الحرارة المنخفضة الحد الذي يحدث أضراراً للغذاء نفسه.

(2) تخفيض النشاط المائي a_w للغذاء من خلال عمليات تجفيف الغذاء أو تجفيده (التجفيف بالتجميد) فبعد تجميد الغذاء تتم عملية إزالة الماء منه عن طريق تحول الماء من الحالة الصلبة (الثلج) إلى الحالة الغازية (بخار الماء) بواسطة عملية التَصْعِيْد أو التسامي

Sublimation تحت التفريغ Under Vacuum، أو من خلال رفع الضغط الاسموزي Osmotic Pressure بإضافة الملح أو السكر كمحاليل إلى الأغذية المحفوظة.

(3) من خلال إضافة المواد الحافظة التي تعمل على منع أو تأخير نمو الأحياء المجهرية في الغذاء.

<u>4- قتل وإبادة الأحياء المجهرية في الغذاء:</u>

إن طرق الحفظ التي تعتمد على قتل وإبادة الأحياء المجهرية في الغذاء تتمثل في استخدام درجات الحرارة المرتفعة (البسترة – الغليان – التعقيم....الخ) أو من خلال استخدام الإشعاع حيث يعرض الغذاء لمصدر إشعاعي (في الغالب كوبلت 60 المشع) فيعطى جرعات محدودة من الإشعاع الذري تتراوح بين 0,1 جراي إلى 10 كيلو جراي بهدف قتل وإبادة الأحياء المجهرية في الغذاء.

الفصل الرابع
الفحوصات الميكروبيولوجية للأغذية
Microbiological Examinations of Food

في الفصول القادمة سوف نبدأ بإذن الله تعالى التعرف على الأحياء المجهرية في كل نوع من أنواع الأغذية كاللحوم والدواجن والأسماك والبيض والخضروات والفواكه والأغذية المعلبة والحبوب والسكر والمياه والحليب ومنتجات الألبان المختلفة، وسوف يتضمن كل فصل من هذه الفصول الحدود الميكروبيولوجية لكل نوع من هذه الأغذية وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية والتي يتم من خلالها قبول أو رفض هذه الأغذية المختلفة من الناحية الميكروبيولوجية، حيث وضعت هذه الحدود في شكل نظام يعرف بخطة تشغيل العينة يوضح درجات القبول وفقاً لخطة تحليل مختبري يوضح درجات القبول والرفض عدد العينات الواجب تحليلها وماهي الفحوصات الميكروبيولوجية التي ينبغي إجراؤها على تلك الأغذية وماهي مستويات الحدود الميكروبيولوجية المطلوب تحقيقها فيها هذه الأغذية. لذا كان من الضروري إفراد فصل خاص بأهم الفحوصات الميكروبيولوجية التي يتم إجراؤها لتلك الأغذية وهو ما ستحمله السطور القادمة.

وتؤخذ العينات طبقاً لطبيعة الأغذية التي سوف يتم إجراء الفحوصات عليها وطبيعة تلك الفحوصات، وبشكل عام يفضل ألا يقل حجم العينة المأخوذة عن 200 جرام في حالة العينات الصلبة أو لتر في حالة العينات السائلة. ويشترط أن تكون العينات المأخوذة ممثلة للغذاء الذي تم أخذها منه، وأن يتم أخذها بطريقة عشوائية، وعند أخذ العينات يجب مراعاة ما يلي:

1 - الحرص على سرعة نقل العينات إلى المختبر، ووضعها في عبوة معقمة تتناسب وطبيعة العينة (جافة، صلبة، أو سائلة) ويتم حفظها بطريقة تتناسب مع حالة العينة (مجمدة، مبردة، أو محفوظة على درجة حرارة الغرفة)، بحيث يتم الحرص على أن تصل عينات الأغذية المجمدة إلى المختبر وهي في حالة متجمدة، وكذلك ينبغي ألا ترتفع درجة حرارة عينات الأغذية المبردة خلال نقلها إلى المختبر ويجب أن تسجل درجة حرارة العينة (حال وصولها للمختبر) إذا كانت سريعة التلف وغير مجمدة.

2 - الحرص على أن تجري الاختبارات على العينة فور وصولها للمختبر وفي حالة تعذر ذلك تخزن العينات المجمدة عند درجة حرارة -18°م حتى وقت الاختبار على ألا تؤجل أكثر من 24 ساعة. كذلك تُخزن العينات غير المجمدة والسريعة التلف عند درجة حرارة تتراوح بين صفر إلى 5°م بحيث لا تزيد مدة التخزين على 24 ساعة، أما العينات غير سريعة التلف والمعلبة أو الأغذية منخفضة الرطوبة فتُخزن عند درجة حرارة الغرفة حتى وقت الاختبار.

3 - قبل إجراء الفحوصات الميكروبيولوجية ترفع درجة حرارة العينات المجمدة لإزالة تجمدها في عبواتها الأصلية أو في الوعاء الذي تم استلامها فيه في المختبر مع تفادي نقل العينة بقدر الإمكان إلى وعاء آخر. وترفع درجة حرارة العينة إلى درجة حرارة تتراوح بين 2 - 5°م خلال 18 ساعة وفي حالة الرغبة في الإسراع في عملية التسييح ترفع درجة حرارة العينات إلى درجة حرارة أقل من 35°م لمدة لا تزيد على 20 دقيقة ويفضل استخدام حمام ماء يمكن التحكم في درجة حرارته على ألا تزيد درجة حرارة الحمام المائي عن 40°م.

تقدير أعداد البكتيريا بطريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count:

وفي هذه الطريقة يتم حساب عدد مستعمرات البكتيريا النامية في الأطباق (أطباق بتري) بعد تحضينها على درجة الحرارة الملائمة لنمو تلك المجاميع البكتيرية، وفي هذه الطريقة يتم وضع كمية من عينة الغذاء وتخفيفاتها (المحضرة) في الأطباق ثم تصب بيئة مناسبة لتنمية تلك المجاميع البكتيرية مثل بيئة أجار عد الأطباق القياسي **Standard Plate Count Agar**. وذلك كالتالي:

1 - يتم عمل تخفيفات من العينة المراد فحصها ابتداء من المعلق الابتدائي (التخفيف الأساسي) وهو المعلق أو محلول المستحلب الذي يجهز بطرق الوزن أو الحجم لكمية من عينة الغذاء المراد فحصها ثم تخلط مع 9 أضعاف من محلول التخفيف، للحصول بقدر الإمكان على توزيع متجانس للبكتيريا في الجزء المختبر من العينة وذلك باستعمال خلاط عند الضرورة مثل الخلاط الدوار **Rotary blender** (بسرعة دوران بين 8000 و 45000 دورة في الدقيقة) والمزود بأوعية زجاجية أو معدنية ذات أغطية محكمة (مقاومة لظروف التعقيم). أو باستخدام خلاط من النوع التموجي **Stoumacher** مزود بأكياس بلاستيك معقمة. أو خلاط دوامي **Vortex** لمزج العينة مع محلول تخفيف في أنبوبة اختبار للحصول على معلق متجانس. وفي حالة وجود جزئيات كبيرة بعد خلط العينة مع محلول التخفيف فإنها تترك لتترسب.

الشكل رقم (125) خلاط دوار **Rotary blender** (يمين)، خلاط من النوع التموجي **Stoumacher** (وسط)، خلاط دوامي **Vortex mixer** (يسار).

2 - مالم يكن هناك محاليل تخفيف أخرى أكثر ملاءمة لتجهيز عينة الغذاء، فإنه يستخدم عادةً محلول الببتون الفسيولوجي Physiological Peptone كمحلول تخفيف وهو يتكون من:
(1,0 جرام بيتون + 8,5 جرام كلوريد الصوديوم (نقي) + ماء مقطر1000 مليلتر).

3 - تجهز التخفيفات العشرية من المعلق الابتدائي بإضافة تسعة أضعاف الحجم من محلول التخفيف وتكرار هذه العملية عند كل تخفيف حتى يتم تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية مناسبة للصب في الأطباق.

4 - ينقل إلى طبقي بتري معقمين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من عينة الغذاء إذا كان سائلاً أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى. ثم ينقل إلى طبقي بتري آخرين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من التخفيف 10^{-1} من عينة الغذاء السائل أو 1 مليلتر من التخفيف العشري 10^{-2} من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى، وهكذا تعاد الطريقة مع التخفيفات الأخرى باستخدام ماصّة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

5 - يصب حوالي 15 مليلتر من بيئة أجار عد الأطباق القياسي (بدرجة حرارة مناسبة قبيل تصلبها) في كل طبق بتري ويجب ألا تزيد المدة بين انتهاء تجهيز المعلق الابتدائي (أو للتخفيف 10^{-1} للغذاء السائل) واللحظة التي تصب عندها البيئة في الأطباق على 15 دقيقة.

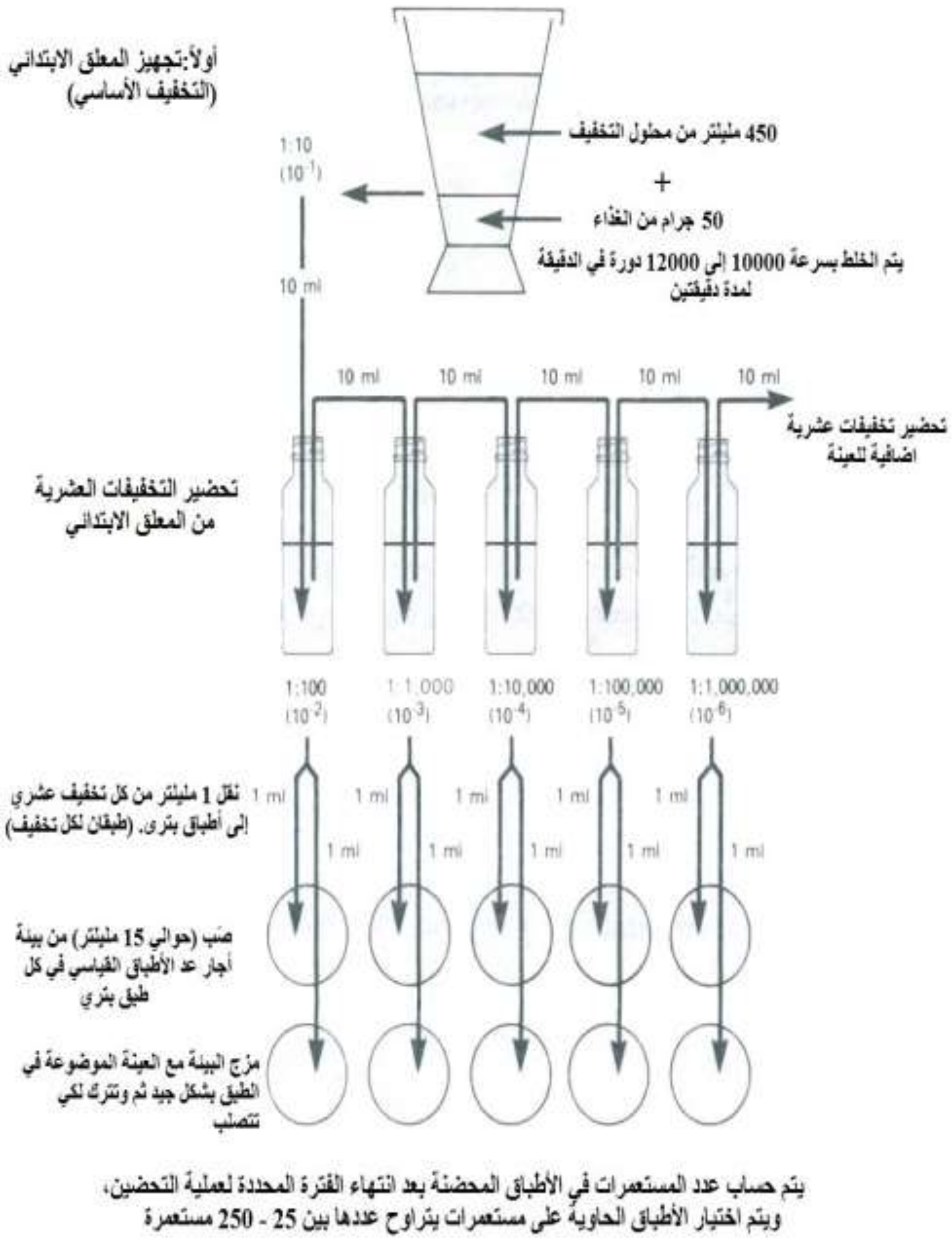
6 - مباشرة بعد صب بيئة أجار عد الأطباق القياسي في الأطباق وقبل تصلبها يجب أن يتم مزج البيئة مع العينة الموضوعة في الطبق بشكل جيد ثم وتترك لكي تتصلب.

7 - تُحضن الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة مناسبة للمجاميع البكتيرية المراد تقدير أعدادها. ففي حالة تقدير أعداد البكتيريا الهوائية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Aerobic Bacterial Count تحضن الأطباق عند درجة حرارة 35°م لمدة 48 ساعة لمعظم الأغذية، لكن يتم استخدام درجة حرارة 32°م لمدة 48 ساعة للحليب ومنتجات الألبان غير المجففة أو لمدة 72 ساعة للحليب المجفف، كما اللجنة الفنية رقم 34 التابعة للمنظمة الدولية للتقييس تبنت استخدام درجة حرارة 30°م لمدة 72 ساعة لمعظم الأغذية. ويجب أن توضح درجة الحرارة التي تم تحضين الأطباق عليها في تقرير الفحص.

8 - يتم حساب عدد المستعمرات في الأطباق المحضنة بعد انتهاء الفترة المحددة لعملية التحضين، ويتم اختيار الأطباق الحاوية على مستعمرات يتراوح عددها بين 25 - 250 مستعمرة.

والشكل التالي يوضح مخطط طريقة تقدير أعداد البكتيريا الهوائية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Aerobic Bacterial Count (أو Aerobic Plate Count)

تقدير أعداد البكتيريا بطريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count

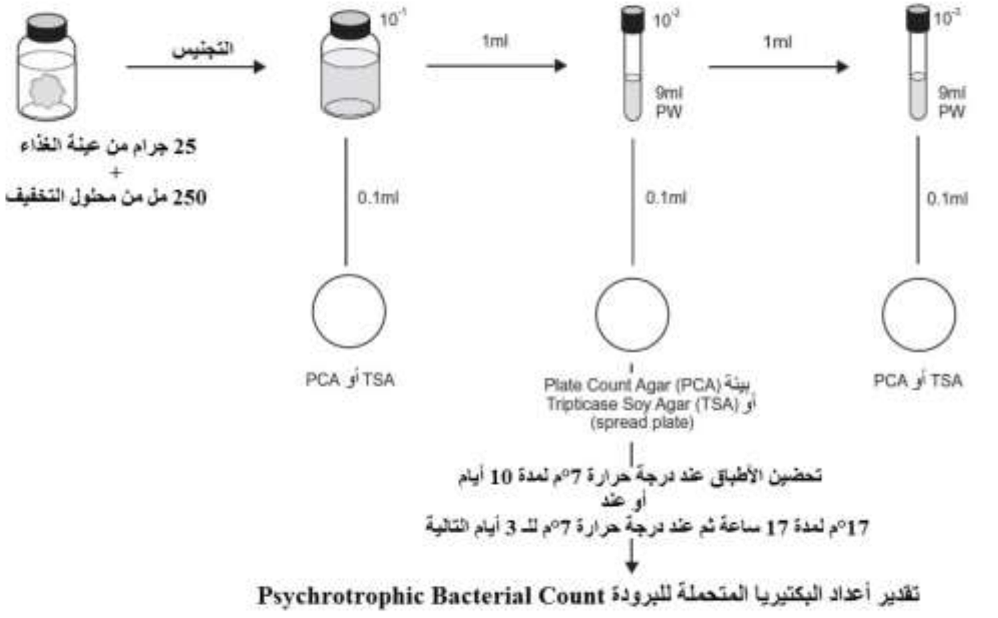


الشكل رقم (126) مخطط تقدير أعداد البكتيريا بطريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count، عن (Andrews, 1992).

تقدير أعداد البكتيريا المتحملة للبرودة Psychrotrophic Bacterial Count:

يتم استخدام طريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count الموضحة سابقاً ايضاً لتقدير أعداد البكتيريا المتحملة للبرودة Psychrotrophic Bacterial Count في الأغذية المحفوظة بالتبريد، ويكمن الاختلاف في تقدير أعداد البكتيريا المتحملة للبرودة عن تقدير أعداد البكتيريا الهوائية المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Bacterial Count في درجة حرارة التحضين للأطباق المصبوبة. وقد عرفنا سابقاً أن الأحياء المجهرية المتحملة للبرودة بأنها تلك الكائنات التي تستطيع النمو بشكل لا بأس به عند درجات حرارة التبريد التجارية من 2 - 7°م بغض النظر عن درجة نموها المثلى، لذلك عندما نريد تقدير أعدادها في الأغذية المحفوظة بالتبريد فيجب أن تحضن الأطباق الحاوية على عينة الغذاء أو تخفيفاتها عند درجة حرارة 7°م لمدة 10 أيام كما يمكن أن نحضن الأطباق الحاوية على عينة الغذاء أو تخفيفاتها عند درجة حرارة 17°م لمدة 17 ساعة ثم عند درجة حرارة 7°م لـ 3 أيام التالية.

ويمكن استخدام بيئة أجار عد الأطباق Plate Count Agar (PCA) أو بيئة تربتكيز أجار الصويا Trypticase Soy Agar (TSA) لتنمية البكتيريا المتحملة للبرودة. وهذا ما يوضحه المخطط التالي:



الشكل رقم (127) مخطط تقدير اعداد البكتيريا المتحملة للبرودة Psychrotrophic Bacterial Count، عن (Silva *et al.*, 2013).

تقدير أعداد البكتيريا المكونة للأبواغ والبكتيريا المقاومة للحرارة:

كذلك يتم استخدام طريقة العد القياسي للأطباق Standard Plate Count أيضاً لتقدير أعداد البكتيريا المكونة للأبواغ الداخلية Endospores Forming Bacterial Count، سواء كانت محبة لدرجات الحرارة المرتفعة Thermophilic Spore-Forming أو محبة لدرجات الحرارة المتوسطة Mesophilic Spore-Forming.

ولتقدير أعداد البكتيريا المكونة للأبواغ الداخلية المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة تُعرّض عينة الغذاء (إذا كان سائلاً) أو المعلق الابتدائي (المحضر من عينات الأغذية غير السائلة) لمعاملة حرارية بوضعها في حمام مائي بدرجة حرارة 80°م لمدة 30 دقيقة وبعد ذلك يتم تبريدها سريعاً ثم تُتَّبع نفس الخطوات التي سبق اتباعها في طريقة العـد القياسي للأطباق ابتداءً من الخطوة رقم (4) وحتى الخطوة رقم (8).

ولا تختلف طريقة تقدير أعداد البكتيريا المكونة للأبواغ الداخلية المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة عما ذكر أعلاه إلا في درجة حرارة المعاملة الحرارية حيث توضع عينة الغذاء (إذا كان سائلاً) أو المعلق الابتدائي (المحضر من عينات الأغذية غير السائلة) في حمام مائي بدرجة حرارة 100°م لمدة 30 دقيقة وبعد ذلك يتم تبريدها سريعاً ثم تُتَّبع نفس الخطوات التي سبق اتباعها في طريقة العـد القياسي للأطباق ابتداءً من الخطوة رقم (4) وحتى الخطوة رقم (6) بعدها تُحضن الأطباق المصبوبة على درجات حرارة تتراوح بين 50 - 55°م لمدة تتراوح بين 48 - 72 ساعة، وبعد ذلك يتم حساب عدد المستعمرات في الأطباق المحضنة بعد انتهاء الفترة المحددة لعملية التحضين، ويتم اختيار الأطباق الحاوية على مستعمرات يتراوح عددها بين 25 - 250 مستعمرة.

أما فيما يخص تقدير أعداد البكتيريا المقاومة للحرارة Thermoduric Bacterial Count فيمكن معرفة درجة التلوث بهذه البكتيريا في الأغذية التي سيتم معاملتها حرارياً بعملية البسترة مثل عصير الفاكهة أو الحليب الخام لأن الحد من ارتفاع تعداد هذه البكتيريا مهم فهي تؤدي إلى زيادة عدد الأحياء المجهرية القياسي بالأطباق للحليب المبستر والمنتجات الغذائية المبسترة الأُخرى. ولتقدير أعداد البكتيريا المقاومة للحرارة يتم بسترة هذه الأغذية مختبرياً بدرجة حرارة 63°م لمدة 30 دقيقة وذلك للقضاء على الأحياء المجهرية غير المقاومة للحرارة وبذلك لا يتبقى إلا البكتيريا المقاومة للحرارة (وكذلك الأبواغ البكتيرية)، بعدها تُتَّبع نفس الخطوات التي سبق اتباعها في طريقة العـد القياسي للأطباق ابتداءً من الخطوة رقم (4) وحتى الخطوة رقم (8).

ويمكن معرفة أعداد البكتيريا المقاومة للحرارة (غير المكونة للأبواغ) فقط من خلال طرح الأعداد المتحصل عليها هنا مع الأعداد الناتجة من تقدير أعداد البكتيريا المكونة للأبواغ الداخلية المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة التي تم حسابها سابقاً.

تقدير أعداد البكتيريا التابعة لعائلة البكتيريا المعويّة *Enterobacteriaceae*:

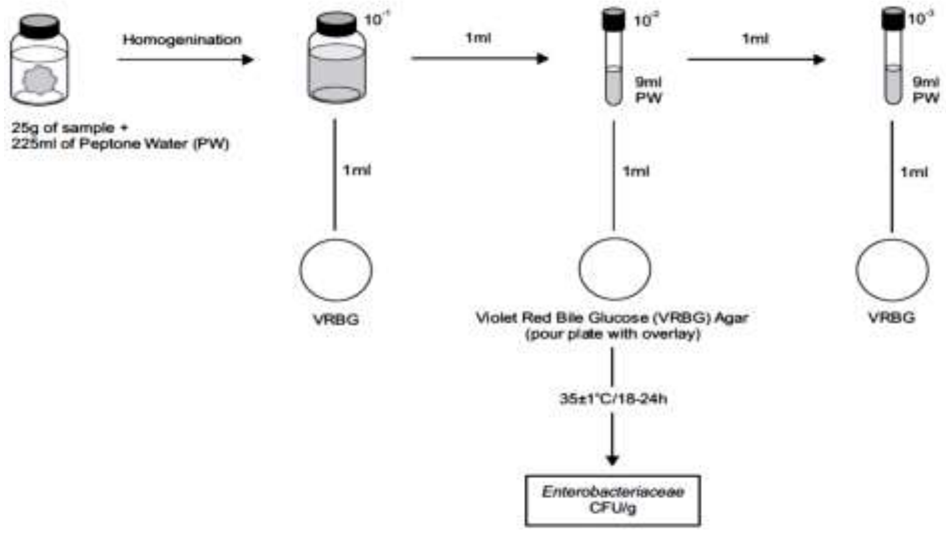
يتم تقدير أعداد البكتيريا التابعة لعائلة البكتيريا المعويّة في الأغذية بزرعها على بيئات مناسبة مثل بيئة **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)** ثم تحضين الأطباق المصبوبة بهذه البيئة على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة، وفيما يلي تفاصيل الطريقة:

1 - تجهز التخفيفات العشرية من عينة الغذاء المراد فحصها أو من المعلق الابتدائي بإضافة تسعة أضعاف الحجم من محلول التخفيف وتكرار هذه العملية عند كل تخفيف حتى يتم تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية مناسبة للصب في الأطباق.

2 - ينقل إلى طبقي بتري معقمين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من عينة الغذاء إذا كان سائلاً أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى. ثم ينقل إلى طبقي بتري آخرين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من التخفيف 10^{-1} من عينة الغذاء السائل أو 1 مليلتر من التخفيف العشري 10^{-2} من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى، وهكذا تعاد الطريقة مع التخفيفات الأخرى باستخدام ماصّة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

3 - يصب حوالي 15 مليلتر من بيئة VRBG (بدرجة حرارة مناسبة قبيل تصلبها) في كل طبق، وبعد صب البيئة في الأطباق وقبل تصلبها يجب أن يتم مزجها مع العينة الموضوعة في الطبق بشكل جيد ثم وتترك لكي تتصلب.

4 - تُحضن الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة ثم يتم بعدها حساب عدد المستعمرات في الأطباق الحاوية على 25 - 250 مستعمرة.



الشكل رقم (128) مخطط تقدير أعداد البكتيريا التابعة لعائلة البكتيريا المعويّة، عن (Silva *et al.*, 2013).

تقدير أعداد بكتيريا القولون Coliform Bacteria:

بكتيريا القولون هي جزء من عائلة البكتيريا المعويّة *Enterobacteriaceae*، هناك عدة طرق لتقدير أعداد بكتيريا القولون في الأغذية والمياه منها طريقة عد المستعمرات في الأطباق، وطريقة العدد الأكثر احتمالاً MPN وكذلك تقدير أعداد بكتيريا القولون في المياه والأغذية السائلة الرائقة بطريقة المرشحات الغشائية (Membrane Filter (MF.

وفيما يلي تفصيل لطريقة تقدير أعداد بكتيريا القولون في الأغذية بِعَد المستعمرات في الأطباق:

1 - تجهز التخفيفات العشرية من عينة الغذاء أو المياه المراد فحصها أو من المعلق الابتدائي بإضافة تسعة أضعاف الحجم من محلول التخفيف وتكرار هذه العملية عند كل تخفيف حتى يتم تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية مناسبة للصب في الأطباق.

2 - ينقل إلى طبقي بتري معقمين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من عينة الغذاء إذا كان سائلاً أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى. ثم ينقل إلى طبقي بتري آخرين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من التخفيف 10^{-1} من عينة الغذاء السائل أو 1 مليلتر من التخفيف العشري 10^{-2} من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى، وهكذا تعاد الطريقة مع التخفيفات الأخرى باستخدام ماصّة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

3 - يصب حوالي 15 مليلتر من بيئة Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL) (بدرجة حرارة مناسبة قبيل تصلبها) في كل طبق بتري ويتم مزج البيئة مع العينة الموضوعة في الطبق بشكل جيد ثم وتترك لكي تتصلب.

4 - بعد إتمام تصلب البيئة في الأطباق يصب حوالي 4 مليلتر من بيئة VRBL عند درجة حرارة 45°م فوق سطح البيئة المتصلبة الملقحة بالعينة وتترك لتتصلب.

5 - تُحضن الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة ثم يتم بعدها حساب عدد مستعمرات بكتيريا القولون في الأطباق الحاوية على 15 - 150 مستعمرة، وتكون مستعمرات بكتيريا القولون بعد التحضين لمدة 24 ساعة ذات لون أحمر أرجواني قطرها 0,05 مليمتر أو أكبر ويحيط بها أحيانًا هالة حمراء مع إفرازات صفراء مترسبة.

أما طريقة العدد الأكثر احتمالاً MPN لتقدير أعداد بكتيريا القولون في الأغذية فهي تسمح بالكشف عن عدد أقل من بكتيريا القولون في الجرام أو المليلتر من عينة الغذاء أو المياه المفحوصة. وتمر طريقة تقدير أعداد بكتيريا القولون بطريقة العدد الاكثر احتمالاً (MPN) بثلاثة مراحل هي:

1- الاختبار الاحتمالي **Presumptive Test**: والذي يتم من خلاله التحري عن احتمال وجود بكتيريا قادرة على تخمير سكر اللاكتوز منتجة غاز. وفي هذا الاختبار يتم تلقيح 15 انبوبة من أنابيب الاختبار الحاوية على مرقِ (حساء) اللاكتوزِ **Lactose broth** أو بيئة مرق لاوريل تربتوز **Laurel tryptose broth**، بعينة الغذاء أو المياه المراد فحصها. وتستخدم 5 أنابيب لكل تخفيف على أن يكون عدد التخفيفات المستخدمة ثلاث على الأقل، فيتم تلقيح 5 انابيب بـ 10 ملليلتر من عينة المياه (مع ملاحظة أن تركيز البيئة في هذه الأنابيب الخمسة ينبغي أن يكون مضاعف) وكذلك تُلقح 5 انابيب بـ 1,0 ملليلتر من العينة والـ 5 انابيب الأخيرة بـ 0,1 ملليلتر من العينة. وفي داخل هذه الأنابيب جميعاً توجد أنابيب صغيرة مقلوبة تدعى أنابيب درهام **Durham tube** للكشف عن تكون الغاز الناتج عن تخمر سكر اللاكتوزِ بواسطة البكتيريا (حيث يُحتجز الغاز داخلها)، وبعد التحضين لمدة 24 ساعة تفحص الأنابيب لملاحظة تكون الغاز من عدمه. الأنابيب الملقحة التي تكون الغاز فيها خلال 24 ساعة تعتبر أنابيب أعطت نتيجة إيجابية للاختبار الاحتمالي **Presumptive Test**، أما التي لم تكوّن غاز فيتم تحضينها لمدة 24 ساعة إضافيةَ للتأكيد، وإذا لم تكوّن غاز خلال هذه الفترة أيضاً فتعتبر النتيجة سلبية، حيث أن عدم تكون غازٍ في الأنابيب دلالة على عدم وجود بكتيريا القولون.

2- الاختبار التأكيدي **Confirmatory Test**: يهدف هذا الاختبار إلى التأكد من أن البكتيريا التي أعطت نتيجة إيجابية في الاختبار الاحتمالي هي بكتيريا القولون. ويتم ذلك باستعمال كُل المزارع الإيجابية في الاختبار الاحتمالي لتَلقيح أنابيب مرقِ صفراء اللاكتوز الأخضر اللامع **brilliant green lactose bile broth**، وتُحضن الأنابيب الملقحة لمدة 48 ± 3 ساعة على درجة حرارة 35°م. يعتبر الاختبار التأكيدي موجبا لبكتيريا القولون في حالة تكون غاز في أنبوبة درهام المقلوبة داخل الأنبوبة الملقحة الحاوية على مرقِ صفراء اللاكتوز الأخضر اللامع في أي وقت خلال لمدة 48 ± 3 ساعة وسالبا إذا لم يتكون غاز. وهنا تُستعملْ الأنابيب الإيجابيةَ المؤكَّدة **Positive Confirmed Tubes** لتقدير أعداد بكتيريا القولون بطريقة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) من خلال الجدول التالي:

جدول رقم (9 أ): حساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 100 مليلتر من العينة، بطريقة الخمس أنابيب المتسلسلة*.

No. of tubes giving a positive reaction :			MPN (per 100 ml)
5 of 10 ml	5 of 1 ml	5 of 0.1 ml	
0	0	0	<2
0	1	0	2
0	2	0	4
1	0	0	2
1	0	1	4
1	1	0	4
1	1	1	6
2	0	0	5
2	0	1	7
2	1	0	7
2	1	1	9
2	2	0	9
2	3	0	12
3	0	0	8
3	0	1	11
3	1	0	11
3	1	1	14
3	2	0	14
3	2	1	17
3	3	0	17
4	0	0	13
4	0	1	17
4	1	0	17
4	1	1	21
4	1	2	26
4	2	0	22
4	2	1	26
4	3	0	27
4	3	1	33
4	4	0	34
5	0	0	23
5	0	1	31
5	0	2	43
5	1	0	33
5	1	1	46
5	1	2	63
5	2	0	49
5	2	1	70
5	2	2	94
5	3	0	79
5	3	1	110
5	3	2	140
5	3	3	180
5	4	0	130
5	4	1	170
5	4	2	220
5	4	3	280
5	4	4	350
5	5	0	240
5	5	1	350
5	5	2	540
5	5	3	920
5	5	4	1600
5	5	5	>1800

*** يستخدم هذا الجدول في حالة إذا كانت سلسلة الأنابيب الخمسة التي تم اختيارها تم تلقيح 5 انابيب منها بـ 10 ملليلتر و 5 انابيب بـ 1,0 ملليلتر والـ 5 انابيب الأخيرة بـ 0,1 ملليلتر من العينة، أما إذا كانت سلسلة الأنابيب الخمسة التي تم اختيارها قد تغيرت كميات التلقيح فيها (كأن تكون تلقيح 5 انابيب بـ 1 مليلتر و 5 انابيب بـ 0,1 مليلتر والـ 5 انابيب الأخيرة بـ 0,01 مليلتر من العينة) في حالات العينات الأكثر تلوثاً، فهناك جداول أخرى لحساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 100 مليلتر من العينة.**

- وفي حالة استخدام طريقة الثلاث الأنابيب المتسلسلة بدلاً عن طريقة الخمس الأنابيب المتسلسلة يستخدم الجدول التالي.

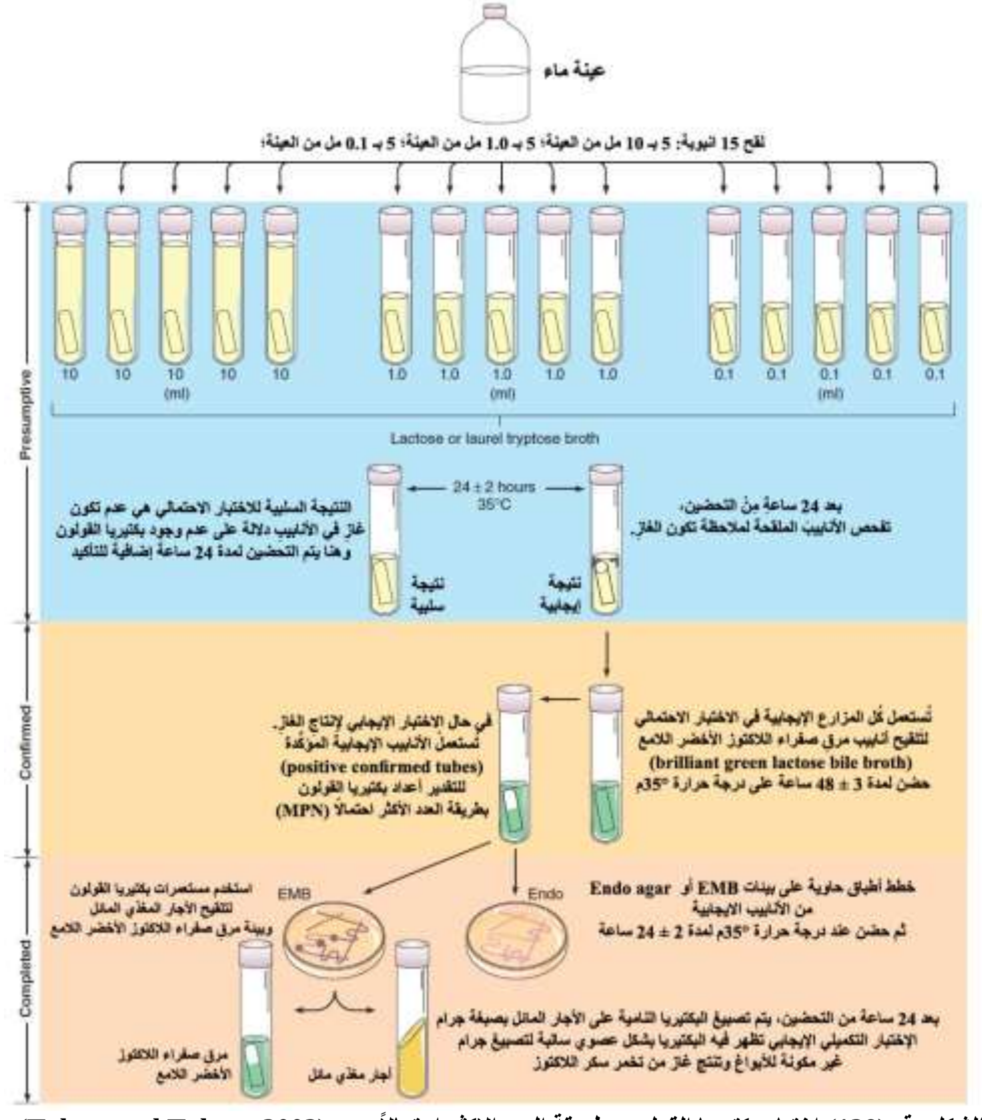
جدول رقم (9 ب): حساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 100 مليلتر من العينة، بطريقة الثلاث أنابيب المتسلسلة*.

No. of tubes giving a positive reaction			MPN (per 100 ml)
3 of 10 ml	3 of 1 ml	3 of 0.1 ml	
0	0	1	3
0	1	0	3
0	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	48
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100

* يستخدم هذا الجدول في حالة إذا كانت سلسلة الأنابيب الثلاث التي تم اختيارها تم تلقيح 3 انابيب منها بـ 10 ملليلتر و 3 انابيب بـ 1,0 ملليلتر والـ 3 انابيب الأخيرة بـ 0,1 ملليلتر من العينة، أما إذا كانت سلسلة الأنابيب الثلاثة التي تم اختيارها قد تغيرت كميات التلقيح فيها (كأن تكون تلقيح 3 انابيب بـ 1 مليلتر و 3 انابيب بـ 0,1 مليلتر والـ 3 انابيب الأخيرة بـ 0,01 مليلتر من العينة) في حالات العينات الأكثر تلوثاً، فهناك جداول أخرى لحساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 100 مليلتر من العينة.

وهناك جداول أخرى لحساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN)، وسيتم توضيح جدول حساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 1 مليلتر من العينة عند استخدام ثلاث أنابيب متسلسلة لاحقاً (ضمن موضوع تقدير أعداد *Bacillus cereus* في الأغذية بطريقة MPN)، مع توضيح كيفية اختيار مجموعة الأنابيب المختارة من اجمالي الأنابيب الموجبة التي تم الحصول عليها وكيفية حساب قيمة العدد الأكثر احتمالا للبكتيريا الموجودة في 1 جرام أو مليلتر من العينة بشكل أكثر تفصيلاً.

3- **الاختبار التكميلي Complementary Test: في هذه المرحلة تُخطط أطباق حاوية على بيئات EMB أو Endo agar من الأنابيب الإيجابيةَ المؤكَّدة Positive Confirmed ثم تُحضن الأطباق المخططة عند درجة حرارة 35°م لمدة 24 ± 2 ساعة. وبعد ظهور نمو على الأطباق المخططة تُستخدم مستعمرات بكتيريا القولون لتلقيح الآجار المغذي المائل وبيئة مرقِ صفراء اللاكتوز الأخضر اللامع، وبعد 24 ساعة من التحضين، يتم تصبيغ البكتيريا النامية على الآجار المائل بصبغة جرام، وبظهور البكتيريا بشكل عصوي سالبة لتصبيغ جرام غير مكونة للأبواغ منتجة غاز من تخمر سكر اللاكتوز يعتبر الاختبار التكميلي إيجابي.**



الشكل رقم (129) اختبار بكتيريا القولون بطريقة العدد الاكثر احتمالاً، عن (Talaro and Talaro, 2002).

ويمكن تقدير أعداد بكتيريا القولون المُتحملـة للحـرارة **Thermotolerant Coliforms** (والتي كانت تُعرف سابقاً ببكتيريا القولون البرازيـة **Fecal Coliforms**، إلا أن مصطلح بكتيريـا القولون المُتحملة للحـرارة **Thermotolerant Coliforms** هو الأدق لأنـهـا تشـمل إضـافة إلـى بكتيريـا ***Escherichia coli*** برازيـة المصـدر علـى أعـداد أقـل مـن أنـواع تنتمـى إلـى أجنـاس ***Klebsiella*** وكذلك ***Citrobacter***، و***Enterobacter***)، من خلال تنميتها عند درجة **44.5**°م.

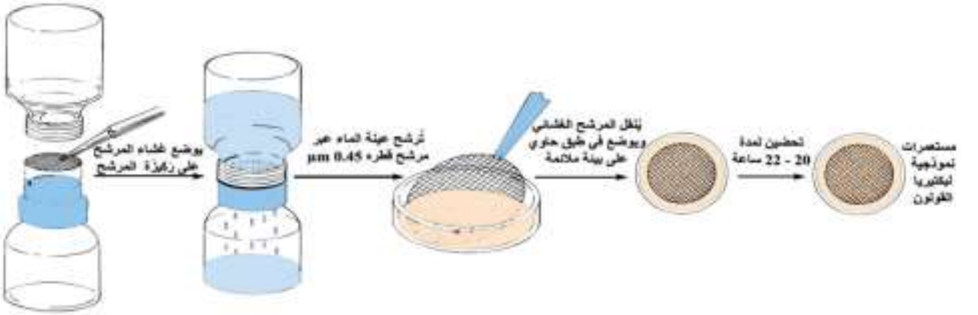
كما يمكن تمييز بكتيريا القولون البرازيـة ***E. coli*** عن غير البرازيـة مثـل ***E. aerogene*** من خـلال التخطيط على بيئـات **EMB** أو **Endo agar** فبكتيريـا ***E. coli*** تظهـر عنـد تخطيطهـا علـى بيئـة **EMB** علـى هيئـة مستعمرات دائريـة صـغيرة مرتفعـة قليلا قطرهـا بـين **2 – 3** مليمتـر تتميز بمركز أسود و بريق معدني مخضر، في حين أن بكتيريـا ***E. aerogenes*** تظهر علـى هيئـة مستعمرات حمـراء أكبـر حجمـاً قطرهـا بـين **4 – 6** مليمتـر أو أكبـر ذات مركـز مـنخفض بلـون بنـي غامق ولا تُظهر ذلك البريق الذي تظهره ***E.* coli** إلا نـادراً وفـي المركـز المـنخفض فقـط، أمـا علـى بيئـة **Endo agar** فتتميز ***E. coli*** بأنـهـا تظهـر علـى هيئـة مستعمرات ذات مركـز داكـن وتتلـون البيئـة حولـهـا بلـون أحمـر داكـن ذات بريـق معـدني أخضـر ذهبـي أمـا ***E. aerogenes*** فتظهـر مستعمراتها وردية اللـون لكن ليس لـهـا مركز داكـن، كمـا يمكـن أن تستخدم الاختبـارات المعروفـة باسم **IMViC** للتفريق بينها كما ذُكر سابقاً.

كمـا تُقـدر أعـداد بكتيريـا القولـون فـي الميـاه باسـتخدام تقنيـة المرشـحات الغشـائية **(MF) Membrane filter technique**، وقد تم استخدام هذه الطريقـة للمرة الاولـى مـن قبـل الباحث الالمـاني **Gootz** عـام **1974**م، وتعتمـد هـذه الطريقـة علـى حجـز البكتيريـا الموجـودة فـي المياه فوق سطح المرشحات المصنوعة من استرات او خـلات السليلوز بسبب صـغر قطـر الثقـوب والتـي غالبـا مـا تتـراوح بـين **0,45 - 0,47** ميكرومتـر، وتنمـى البكتيريـا المحجـوزة مباشـرة علـى المرشح بوضعه على بيئة مناسبة، وباستعمال بيئـة انتقائيـة معينـة فانـه يمكن تقدير اعداد انـواع معينـة من البكتيريا مثل بكتيريا القولون او أي انواع بكتيرية أخرى موجودة في المياه.

وتتميـز تقنيـة المرشـحات الغشـائية **(MF) Membrane filter technique** بقـدرتـهـا على اختبار كميات كبيرة من المياه قد تصل الى لتر أو أكثر وبهـذا يمكن عزل بكتيريـا متواجـدة أو محتمل أن تكون متواجدة في المياه وبأعداد قليلـة مثـل ***Salmonella*** وبـذا تقـل نسـبة الخطـأ، كمـا أنـهـا تعتبر طريقة سريعة حيث يمكن الحصول على نتائج الاختبار بعد التحضين لفترة **18** سـاعة أو أقل.

وتتلخص طريقة أعداد بكتيريا القولون باستخدام تقنية المرشحات الغشائية (MF) بوضع غشاء الترشيح المعقم الذي قطر مسامه 0,45 ميكرومتر على القرص المسامي لوحدة الترشيح (رَكِيزَة المرشح) باستعمال ملقط معقم بحيث يكون السطح المسامي لغشاء الترشيح إلى أعلى ويثبت القرص في مكانه يتم ترشيح عينة لا يقل حجمها عن100 مليلتر بإمرارها خلال غشاء الترشيح مع استعمال تفريغ جزئي، ثم ينقل غشاء الترشيح المستخدم في ترشيح العينة ويوضع فوق قرص الامتصاص المشبع بـ 1.8 – 2 مليلتر من بيئة M-Endo Broth في حال تقدير بكتيريا القولون الكلية ويحضن عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 – 22 ساعة ثم تُعد المستعمرات ذات اللون الوردي إلى الأحمر الغامق والتي لها بريق معدني أخضر ذهبي.

وفي حال تقدير بكتيريا القولون المُتحملة للحرارة Thermotolerant Coliforms (التي كانت تُعرف ببكتيريا القولون البرازية) تستخدم بيئة M-FC Broth ويتم التحضين عند درجة حرارة 44,5°م لمدة 20 – 22 ساعة ثم تُعد المستعمرات ذات اللون الأزرق.



الشكل رقم (130) تقدير أعداد بكتيريا القولون بطريقة المرشحات الغشائية (MF)، عن (Prescott, 2002).

تقدير أعداد الخمائر والأعفان Yeasts and molds في الأغذية:

تتلخص طريقة تقدير أعداد الخمائر والأعفان في الأغذية عن طريق عد المستعمرات من خلال إعداد أطباق مصبوبة باستعمال بيئة انتقائية معينة تُلقح بكمية محددة في العينة المختبرة إذا كان المنتج سائلاً أصلاً أو من المعلق الابتدائي في حالة المنتجات الأخرى.

وعند تقدير أعداد الخمائر والأعفان يجب التخلص من البكتيريا المنافسة في وسط الزرع (البيئة المستخدمة) وذلك باستخدام المضادات الحيوية ذات الطيف الواسع التي يتم إضافتها للبيئة مثل المضاد الحيوي كلورأمفينيكول أو المضاد الحيوي أوكسي تتراسيكلين هيدروكلوريك (بنسبة 0,1 جرام/لتر) بحيث يُصبح التركيز النهائي لهذه المضادات الحيوية 100 ميكروجرام/مليلتر من البيئة. كما يمكن التخلص من البكتيريا المنافسة في وسط الزرع بتعديل الأس الهيدروجيني pH لبيئة الزرع بحيث يكون بين 3.5 - 3.8 وذلك بواسطة محلول 10 % حامض لاكتيك أو طرطريك.

ومن البيئات المستخدمة في تقدير أعداد الخمائر والأعفان بيئة أجار الدايكلوران وزهرة البنغال والكلورأمفينيكول Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar للأغذية التي يكون نشاطها المائي (a_w) أعلى من 0,95، أو بيئة أجار الدايكلوران 18% جليسرول Dichloran 18% Glycerol Agar للأغذية التي نشاطها المائي أقل أو مساوي لـ 0,95.

كما يمكن استخدام بيئات أخرى مثل بيئة آجار الدكستروز ومستخلص الخميرة والكلورأمفينيكول Dextrose Yeast Extract Chloramphenicol Agar أو بيئة أجار الدكستروز ومستخلص البطاطس Potato Dextrose Agar المضاف لها الكلورأمفينيكول أو الأوكسي تتراسيكلين هيدروكلوريك (بنسبة 0,1 جرام/لتر)، أو المضاف لها محلول 10 % حامض لاكتيك أو طرطريك لخفض الأس هيدروجيني للبيئة المعقمة إلى (pH 3,5).

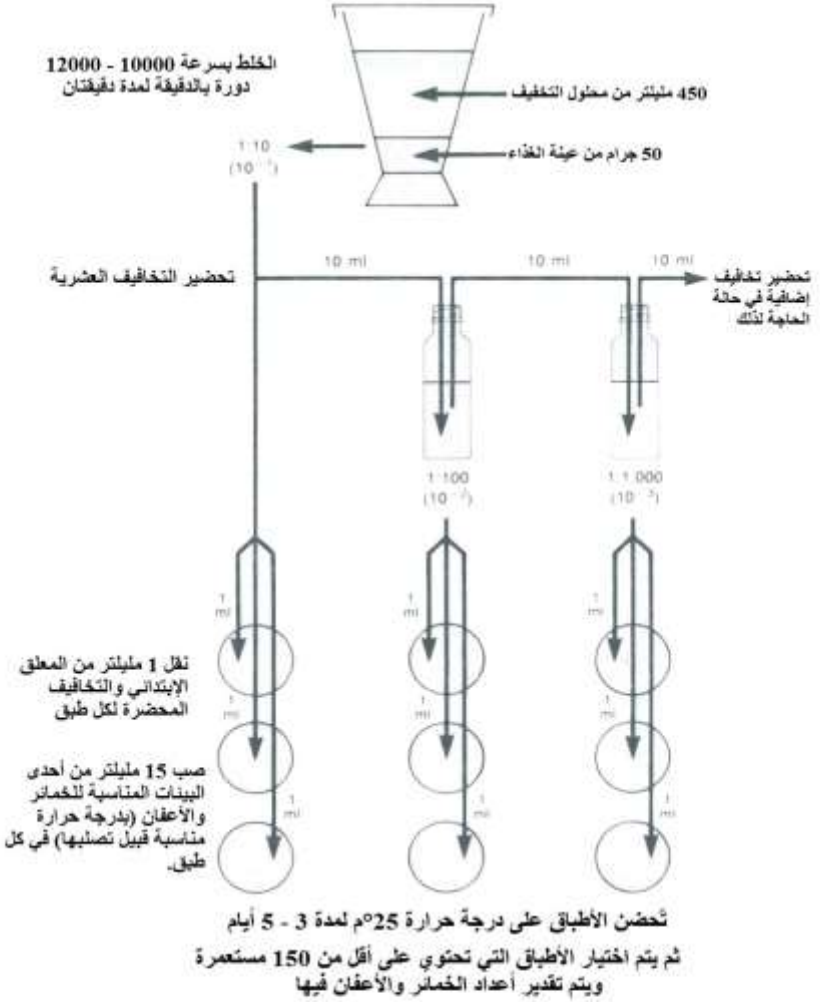
وتتلخص طريقة تقدير أعداد الخمائر والأعفان في الأغذية عن طريق عد المستعمرات بالآتي:

1 - تجهز التخفيفات العشرية من عينة الغذاء المراد فحصها أو من المعلق الابتدائي بإضافة تسعة أضعاف الحجم من محلول التخفيف وتكرار هذه العملية عند كل تخفيف حتى يتم تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية مناسبة للصب في الأطباق.

2 - ينقل إلى طبقي بتري معقمين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من عينة الغذاء إذا كان سائلاً أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى. ثم ينقل إلى طبقي بتري آخرين باستخدام ماصة معقمة 1 مليلتر من التخفيف 10^{-1} من عينة الغذاء السائل أو 1 مليلتر من التخفيف العشري 10^{-2} من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الأخرى، وهكذا تعاد الطريقة مع التخفيفات الأخرى باستخدام ماصّة معقمة جديدة لكل تخفيف عشري.

3 - يصب حوالي 15 مليلتر من أحدى البيئات المناسبة المذكورة سابقاً (بدرجة حرارة مناسبة قبيل تصلبها) في كل طبق ثم مزجها مع العينة الموضوعة في الطبق جيداً وتترك لكي تتصلب.

4 - تُحضن الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25°م لمدة 3 - 5 أيام ثم يتم بعدها حساب عدد المستعمرات في كل طبق بعد 3 و 4 و 5 أيام من التحضين، وبعد 5 أيام يحتفظ بالأطباق التي تحتوي على أقل من 150 مستعمرة. إذا كانت أجزاء من الأطباق مغطاة بنمو الفطر أو كانت عملية عد المستعمرات المنفصلة عن بعضها انفصالاً جيداً صعبة يحتفظ بالأعداد المتحصل عليها بعد 4 أيام (أو حتى بعد 3 أيام) من التحضين، وفي هذه الحالة تسجل فترة التحضين (3 أو 4 أيام) في تقرير الفحص.



الشكل رقم (131) مخطط تقدير أعداد الخمائر والأعفان في الأغذية عن طريق عد المستعمرات، عن (Andrews, 1992).

تقدير أعداد الخمائر والأعفان المتحملة للبرودة في الأغذية:

تكتسب الخمائر والأعفان المتحملة للبرودة أهمية في الأغذية المحفوظة بالتبريد، فهي وكما عرفنا سابقاً تنتمي لتلك الكائنات التي تستطيع النمو بشكل لا بأس به عند درجات حرارة التبريد التجارية من 2 - 7°م بغض النظر عن درجة نموها المثلى. وتتشابه طريقة تقدير أعداد الخمائر والأعفان عموماً مع طريقة تقدير أعداد الخمائر والأعفان المتحملة للبرودة، ويكمن الاختلاف في الطريقتين في درجة الحرارة التي يتم عندها تحضين الأطباق المصبوبة بالبيئة (الوسط الزرعي)، حيث أنه بدلاً من التحضين عند درجة حرارة 25°م لمدة 3 - 5 أيام يتم التحضين عند درجة حرارة 7°م لمدة 10 أيام أو عند درجة حرارة 17°م لمدة 17 ساعة يليها التحضين عند درجة حرارة 7°م لـ 3 أيام التالية.

تقدير أعداد الأعفان المقاومة للحرارة:

تقضي البسترة على جميع الأعفان عدى الأنواع المنتجة للأجسام الحجرية **Sclerotia**، أو جراثيم بعض أنواع الأعفان المقاومة للحرارة **Heat-resistant mold spores**، حيث وجد أن هذه الأنواع تقاوم درجات الحرارة المرتفعة، وبذلك فإنها تتسبب في مشاكل كثيرة في الأغذية المعلبة (وعلى الأخص عصائر الفاكهة المعلبة)، وبالتالي فإنه كثيراً ما يجرى اختبار الكشف عن وجود هذه الأنواع في الأغذية المعدّة للتصنيع وفقاً للخطوات الآتية:

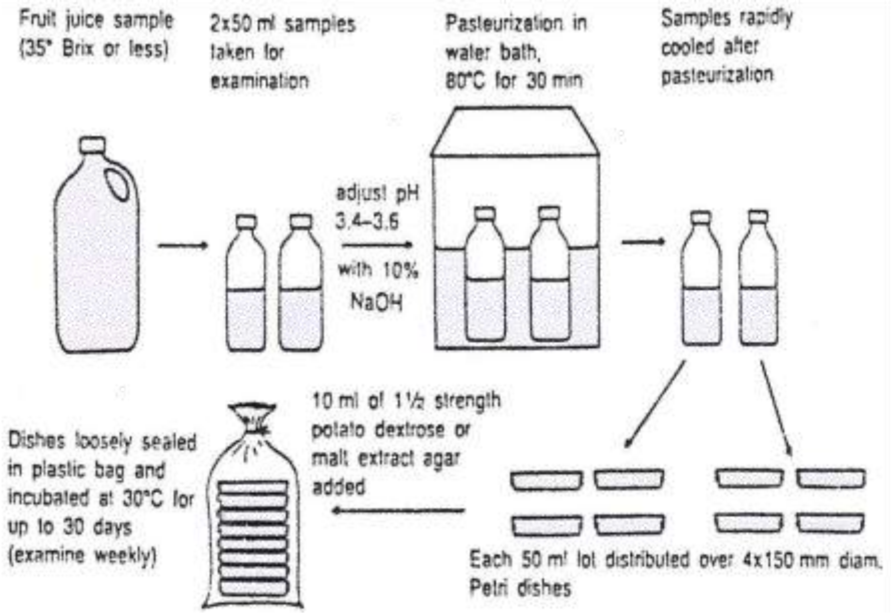
1 - تؤخذ عينة من عصير الفاكهة المركز الذي يكون تركيزه 35 بيركس **Brix** أو أقل، وفي حالة ما إذا كان تركيز عينة عصير الفاكهة المركز أعلى من 35 بيركس **Brix** فيتم تعديل التركيز بإضافة ماء مقطر معقم. وتوضع هذه العينة في عبوتين زجاجيتين تحوى كل منهما على 50 مليلتر من العينة، وفي حالة عينات شراب الفاكهة يتم توزيع العينة في عبوتين زجاجيتين تحوى كل منهما على 50 مليلتر مباشرة دون تخفيف.

2 - يتم تعديل الأس الهيدروجيني في العينات الخاضعة للفحص إلى 3,4 - 3,6 (باستخدام محلول 10 % هيدروكسيد الصوديوم **NaOH**).

3 - يتم بسترة عينات الاختبار مختبرياً في حمام مائي على درجة حرارة 80°م لمدة 30 دقيقة ثم تبرد سريعاً لدرجة حرارة الغرفة.

4 - كل جزء من العينة (العبوة الزجاجية الحاوية على 50 مليلتر من العينة) توزع بالتساوي على 4 أطباق بتري كبيرة معقمة (قطر الطبق 150 مليمتر). ويضاف لكل طبق 10 مليلتر من بيئة أجار الدكستروز ومستخلص البطاطس **Potato Dextrose Agar** المحضرة بقوة 1½، والمضاف لها الكلورأمفينيكول لتثبيط نمو البكتيريا المنافسة. كما يمكن كذلك استخدام بيئة أجار مستخلص المولت **Malt Extract Agar** بنفس الشروط.

5 - بعد صب البيئة مباشرة في الأطباق وقبل تصلبها يجب أن يتم مزجها مع العينة الموضوعة في الطبق بشكل جيد ثم وتترك لكي تتصلب، وبعد أن تتصلب توضع الأطباق في أكياس بلاستيكية يتم غلقها على نَحوٍ غَيْرِ مُحْكَم وتحضن على درجة حرارة 30°م لمدة تصل إلى 30 يوم، ويتم فحص تلك الأطباق اسبوعياً خلال تلك الفترة لملاحظة أي نمو عفني من عدمه.



الشكل رقم (132): يوضح طريقة الكشف عن وجود الأجسام الحجرية وجراثيم أنواع الأعفان المقاومة للحرارة، عن (Vanderzant and Splittstoesser, 1992).

التعرف على الأعفان المعزولة من الأغذية:

يتم التعرف على الأعفان في الأغذية من خلال الصفات المظهرية (المورفولوجية) لتلك الأعفان المعزولة من الأغذية، وهذا ما سبق التعرف عليه في فصل سابق ضمن موضوع الأعفان ذات الأهمية في الأغذية.

دراسة الخمائر المهمة في مجال الأغذية معملياً:

عند دراسة الخمائر المهمة في مجال الأغذية معملياً من الضروري تثبيط نمو الأعفان، ولمنع نمو الأعفان في الوسط الزرعي يمكن استعمال المواد التالية:

1- مادة ثنائي الفنيل Diphenyl بتركيز 0.01 %.
2- مادة ثنائي بروبيونات الصوديوم Na-Propionate بتركيز بين 0.25 إلى 0.35 %.
3- مادة صفراء الثور Oxgall بتركيز 1 %.
4- مادة زهرة البنغال Rose Bengal بتركيز 0.003 %.

عزل وتشخيص بكتيريا *Clostridium botulinum* في الأغذية:

يتم عزل وتشخيص بكتيريا ***Clostridium botulinum*** في الأغذية من خلال الخطوات الآتية:

1 - تنقل الأغذية الصلبة (الخالية أو المحتوية على القليل من السوائل الحرة) بطريقة معقمة إلى هاون معقم ويضاف لها كمية مساوية من محلول هلام الفوسفات المنظم (المكون من 2 جرام جيلاتين + 4 جرام Na_2HPO_4 ثم يكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر)، ثم تطحن العينة جيدا باستخدام يد هاون معقمة، ويمكن الاستعاضة عن الطريقة السابقة بتلقيح أجزاء أو قطع بسيطة من العينة بشكل مباشر في بيئات مدعمة سائلة باستخدام ملقط معقم. بينما تلقح الأغذية السائلة مباشرة في تلك البيئات السائلة باستخدام ماصة معقمة. كما يجب أن يحتفظ بجزء كافٍ من العينة المحضرة في وِعَاء معقم للعينات ريثما يتم استخدامها في اختبارات أخرى (حسب الحاجة). وقبل تلقيح البيئات السائلة المدعمة يزال الأكسجين الذائب فيها عن طريق التبخير لمدة 10 – 15 دقيقة ثم تبرد البيئة بسرعة وتترك دون تحريك قبل تلقيح.

2 - ينقل 1 – 2 مليلتر من عينات الأغذية السائلة أو 1 – 2 جرام من عينات الأغذية الصلبة أو شبه الصلبة إلى أنبوبتين تحتويان على 15 مليلتر من بيئة مرق (حساء) الكبد المفروم Chopped Liver Broth أو بيئة مرق اللّحم المطبوخ Cooked Meat Broth، وتحضن الأنابيب لاهوائياً على درجة حرارة 35°م. وفي الوقت نفسه يتم نقل 1 – 2 مليلتر أو 1 – 2 جرام من العينات إلى أنبوبتي اختبار من مرق تربتكيز الببتون، الجلوكوز ومستخلص الخميرة Trypticase Peptone Glucose Yeast extract Broth (TPGY) للكشف عن السلالات غير المحللة للبروتين وتحضن الأنابيب لاهوائياً على درجة حرارة 26°م.

3 - بعد مرور خمسة أيام من التحضين تفحص جميع الأنابيب للكشف عن وجود تعكر أو تكون غاز أو تحلل لقطع اللحم كما تلاحظ رائحة الأنابيب. ثم يتم عمل مسحة من المزارع على سطح شريحة مجهرية تصبغ بصبغة جرام ويلاحظ الشكل النموذجي لجنس ***Clostridium*** الذي يتميز بكونه عصيات موجبة لتصبيغ جرام لها أبواغ بيضاوية شبه طرفية.

4 - يتم ترك الأنابيب المحضنة لمدة إضافية (لعزل بكتيريا ***Clostridium botulinum***)، حيث أن ترك الأنابيب لمدة 7 أيام يكون كافياً للوصول إلى نشاط فعال من نمو البكتيريا وإنتاج تركيز مرتفع من السم الوشقي، وإذا لم يظهر أي نمو فيتم التحضين لمدة 10 أيام إضافية لاستكشاف وإنبات الأبواغ المتأخرة (قبل أن يحكم على العينة أنها خالية من بكتيريا ***Clostridium***). وبعد التحضين يتم إنتاج الأبواغ في هذه الأنابيب المحضنة، وتحفظ المكثرة في الثلاجة عندما يصبح إنتاج الأبواغ فيها كبيرًا وذلك بهدف عزل المزارع النقية منها.

5 - لعزل بكتيريا *Clostridium botulinum* النقية هناك عدد من المعاملات الأولية مثل تسخين المزارع السائلة للبكتيريا لدرجة حرارة 80°م لمدة 10 – 15 دقيقة (للقضاء على أي خلايا خضرية)، أو إضافة 1 – 2 مليلتر من مزارع البيئات السائلة المدعمة مع حجم مساوي من كحول نقي معقم بالترشيح إلى أنبوبة معقمة ذي غطاء ثم تحضن الأنبوبة بعد مزجها بشكل جيد لمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة العادية وذلك للأنواع غير المحللة للبروتين من بكتيريا *Clostridium*، ثم يتم تخطيط أطباق حاوية على بيئة آجار صفار البيض مع كبد العجل أو بيئة آجار صفار البيض اللاهوائي باستخدام إبرة تلقيح ثم تحضن الأطباق المخططة لاهوائياً على درجة حرارة 35°م لمدة 48 ساعة. بعدها يتم انتقاء 10 مستعمرات نموذجية منفصلة من بكتيريا *Clostridium botulinum* التي تتباين أشكالها من المسطحة إلى المرتفعة ومن الخشنة إلى الناعمة كما تتصف بالانتشار وبامتلاكها لحواف غير منتظمة.

تظهر المستعمرات النامية على بيئة آجار صفار البيض ألوان مشابهة لألوان قوس قزح لدى تعريض سطحها لضوء مائل، هذه الحلقة اللماعة تعود إلى طبقة متلألئة تمتد عادة خارج سطح المستعمرة مشكلة أقواساً غير منتظمة تابعة للمستعمرة. كما تحاط هذه المستعمرات أيضاً بحلقة أخرى عريضة عبارة عن راسب أصفر، ومن الصعوبة بمكان تمييز أنواع البكتيريا المنتجة للسموم عن غير المنتجة لتشابهما في الصفات المورفولوجية والمزرعية.

6 - ينقل بالاستعانة بإبرة تلقيح معقمة لقاح من كل مستعمرة مختارة إلى أنابيب مرق اللحم أو الكبد وتحضن الأنابيب لاهوائياً لمدة 5 أيام على درجة حرارة 35°م، على أن ينقل لقاح للكشف عن أنواع البكتيريا غير المحللة للبروتين إلى مرق TPGY وتحضن أيضاً لاهوائياً لمدة 5 أيام على درجة حرارة 26°م.

7 - يعاد تخطيط المزارع على زوج من أطباق بيئة آجار صفار البيض ويحضن أحد الطبقين لاهوائياً بينما يحضن الطبق الآخر هوائيا على درجة حرارة 35°م. يجب أن تظهر المستعمرات النموذجية فقط في الطبق المحضن لاهوائيا كدليل على نقاوة المزرعة ويعزى الفشل في العزل إلى وجود أعداد قليلة من البكتيريا ضمن مزيج من البكتيريا الطبيعية، وفي هذه الحالة يكرر النقل والتكثير ضمن ظروف معقمة لزيادة فعالية العزل وتحفظ المزارع النقية عند بلوغها مرحلة التبوغ في الثلاجة أو المجمدة.

الكشف عن السم الوشقي المفرز من بكتيريا *Clostridium botulinum*:

يتم الكشف عن السم الوشقي من خلال الإجراءات التالية:

1 - يتم هرس الغذاء المشتبه وجود السم فيه (أو مزج مُعلق بيئة **Cooked Meat Medium**) مع كمية مساوية له من محلول ملحي فسيولوجي (0,85 % NaCl) معقم، أو كمية مساوية له من محلول هلام الفوسفات المنظم المكون من: (2 جرام جلاتين + 4 جرام Na_2HPO_4 + ماء مقطر1000 مليلتر) المعقم، الذي يُضبط رقمه الهيدروجيني عند 6,2 pH.

2 - تجرى عملية طرد مركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي السريع تحت التبريد وتعزل المواد الصلبة عن السائلة.

3 - تغسل الحاويات الفارغة للعينات (التي يعتقد بأنها تحتوي على السم) بواسطة بعض مليلترات من محلول هلام الفوسفات المنظم، ويضاف المحلول الناتج عن الغسل إلى السائل المفصول بالطرد المركزي.

4 - لتجنب حالات الوفاة غير المعروفة لفئران التجارب، يتم ترشيح السائل المجمع بواسطة مرشحات غشائية من خلات السيليلوز قبل حقن فئران التجارب به.

5 – في حالة السلالات غير المحللة للبروتينات يتم إضافة التربسين (فكما عرفنا من ميكانيكية التسمم الوشقي أن السمّ يجزئ بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين المفرزة من قبل البكتيريا أو المفرزة في جسم الإنسان لإنتاج سلسلتي عديد الببتيد)، لذا يجب معالجة جزء من الغذاء وسوائل الغذاء أو بيئة TPGY بالتربسين قبل إجراء اختبارات السمية. وهنا يتم تعديل جزء من السائل إذا لزم الأمر لـ 6,2 pH ثم يتم أضافة 0,2 مليلتر من محلول التربسين (المحضر حسب تعليمات المُنتج) لكل 1,8 مليلتر من السوائل المعدة لاختبار السمية.

6 - تحضن السوائل المعاملة بالتربسين على درجة حرارة 35°م لمدة ساعة.

7 – يتم عمل تخفيفات لجزء من السوائل المعدة لاختبار السمية غير المعاملة وأيضا المعاملة بالتربسين بنسب 1 : 2 و 1 : 10 و 1 : 100 باستخدام محلول هلام الفوسفات المنظم.

8 - تحقن فئران التجارب بالسائل الناتج عن عملية الطرد المركزي كما يلي:

أ- يوضع مقدار 2 مل من السائل المرشح في أنبوبة اختبار ثم توضع في حمام مائي يغلى ولمدة 10 دقائق ثم يحقن أحد الفئران بمقدار 0,5 مل من السائل المرشح بعد تبريده. وذلك لغرض المقارنة بالنسبة لتأثير الحرارة على إبطال فاعلية السم.

ب- يتم حقن اثنان من فئران التجارب بمقدار 0,5 مل من السائل المرشح غير المغلي وذلك مقابل كل نوع من أنواع مضادات السم المتوفرة. بمعنى إذا كان لدينا ثلاثة من أنواع مضادات السم فأننا نحقن ستة من الفئران بالسائل المرشح.

ج- يتم حقن فأر واحد من بين كل فأرين سبق وأن أعطيا السائل المرشح في الخطوات السابقة، بجرعة من مضادات السم المختلفة تكفي لحماية ألف 1000 فأر لضمان إبطال فعالية السم الذي قد يتواجد في الغذاء بنسبة عالية.

د- تترك الفئران تحت المراقبة لمدة أربعة أيام، حيث تظهر أعراض التسمم الوشقي على الفئران التي حقنت بالسائل المرشح الذي يحتوي على السم بدون أن تحقن بمضادات السم (حيث تبدأ الأعراض بصعوبة في التنفس و انكماش الأرجل الخلفية وتزيد حالة الضعف وعادة تموت الفئران خلال 24 ساعة من الحقن). في حين لا تظهر على الفئران التي حقنت بالسائل المرشح وبمضادات السم في الوقت نفسه وكذلك لا تظهر في الفئران التي حقنت بالسائل المرشح المغلي.

ونستطيع تمييز نوع السم من خلال عدم ظهور الأعراض على الفئران المحقونة بمضاد السم لهذا النوع، فمثلاً لو كان السم الموجود في الغذاء من النوع (A) فأن الفأر المحقون بمضاد السم من النوع A لا تظهر عليه الأعراض في حين تظهر الأعراض على الفئران الأخرى وهكذا.

عزل وتشخيص بكتيريا *Staphylococcus aureus* في الأغذية:

الأساس في عزل وتشخيص بكتيريا *Staphylococcus aureus* يتمثل في تلقيح سطح بيئة Baird-Parker agar الانتقائية في طبقين متماثلتين بكمية محددة من العينة المختبرة في حالة المنتجات السائلة أو بكمية محددة من المعلق الابتدائي للعينة في حالة المنتجات الصلبة، ويتم التلقيح تحت نفس الظروف باستعمال التخفيفات العشرية للعينة أو للمعلق الابتدائي، وذلك كالتالي:

1 - ينقل إلى كل من طبقي الآجار 0,1 مليلتر من عينة الاختبار بواسطة ماصة معقمة في حالة المنتجات السائلة أو 0,1 مليلتر من المعلق الابتدائي (تخفيف 10^{-1}) للعينة في حالة المنتجات الصلبة وتكرر الخطوات للحصول على التخفيف 10^{-1} والتخفيفات الأعلى إذا لزم الأمر.

2 - أما إذا كان المطلوب تقدير الأعداد القليلة من بكتيريا *Staphylococcus aureus* في منتجات معينة، يمكن زيادة حساسية الكشف عشرة أضعاف وذلك بالتلقيح بـ 1 مليلتر من عينة الاختبار إذا كانت سائلة أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في المنتجات الصلبة، ثم يوزع اللقاح على سطح ثلاثة أطباق أجار صغيرة (90 مليمتر)، بكميات 0,3 و 0,3 و 0,4 مليمتر في كل طبق، في تكرارات مزدوجة باستعمال ستة أطباق صغيرة.

3 - ينشر اللقاح بحذر وبأسرع ما يمكن على سطح طبق الآجار وباستعمال قضيب زجاجي على شكل حرف L مع تجنب ملامسة جوانب الطبق ويستعمل قضيب زجاجي معقم لكل طبق. وتغطى الأطباق وتترك لتجف لمدة حوالي 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تقلب الأطباق المجهزة ثم تحضن عند درجة حرارة 35°م لمدة 24 – 48 ساعة.

4 - بعد التحضين لمدة 24 – 26 ساعة توضع علامة على قاع الأطباق عند مواقع أي مستعمرات نموذجية موجودة لبكتيريا *Staphylococcus aureus*، والمستعمرات النموذجية للبكتيريا النامية على بيئة Baird-Parker agar تكون سوداء لامعة محدبة (قطرها من 1 إلى 1,5 مليمتر بعد التحضين 24 ساعة ومن 1,5 إلى 2,5 مليمتر بعد التحضين 48 ساعة) ومحاطة بمنطقة شفافة وقد تكون معتمة جزئياً. وقد تظهر في المنطقة الشفافة حلقة متلألئة متصلة بالمستعمرات وذلك بعد التحضين لمدة 24 ساعة. وتكون المستعمرات غير النموذجية متشابهة في المظهر ولكن لا يوجد بها منطقة شفافة. يعاد تحضين جميع الأطباق عند درجة حرارة 35°م لمدة 22 – 24 ساعة أخرى. ثم توضع علامة مكان أي مستعمرات نموذجية جديدة، كما توضع علامة مكان أي مستعمرات غير نموذجية موجودة. (وفي حالة نشر 1 مليلتر من اللقاح على سطح ثلاثة أطباق تعامل الأطباق الثلاثة كطبق واحد في جميع الإجراءات التأكيدية والإحصائية التالية لذلك).

5 - تؤخذ فقط الأطباق التي تحتوي على 20 - 200 مستعمرة نموذجية و/أو غير نموذجية. وتحسب أعداد بكتيريا ***Staphylococcus aureus*** في كل مليلتر أو جرام من العينة بعد المستعمرات النموذجية و/أو غير النموذجية المتحصل عليها في الأطباق عند حدود التخفيف المختارة بحيث تعطي نتيجة ملموسة ثم تؤكد باختبار إنزيم التخثر (الكوأجيوليز).

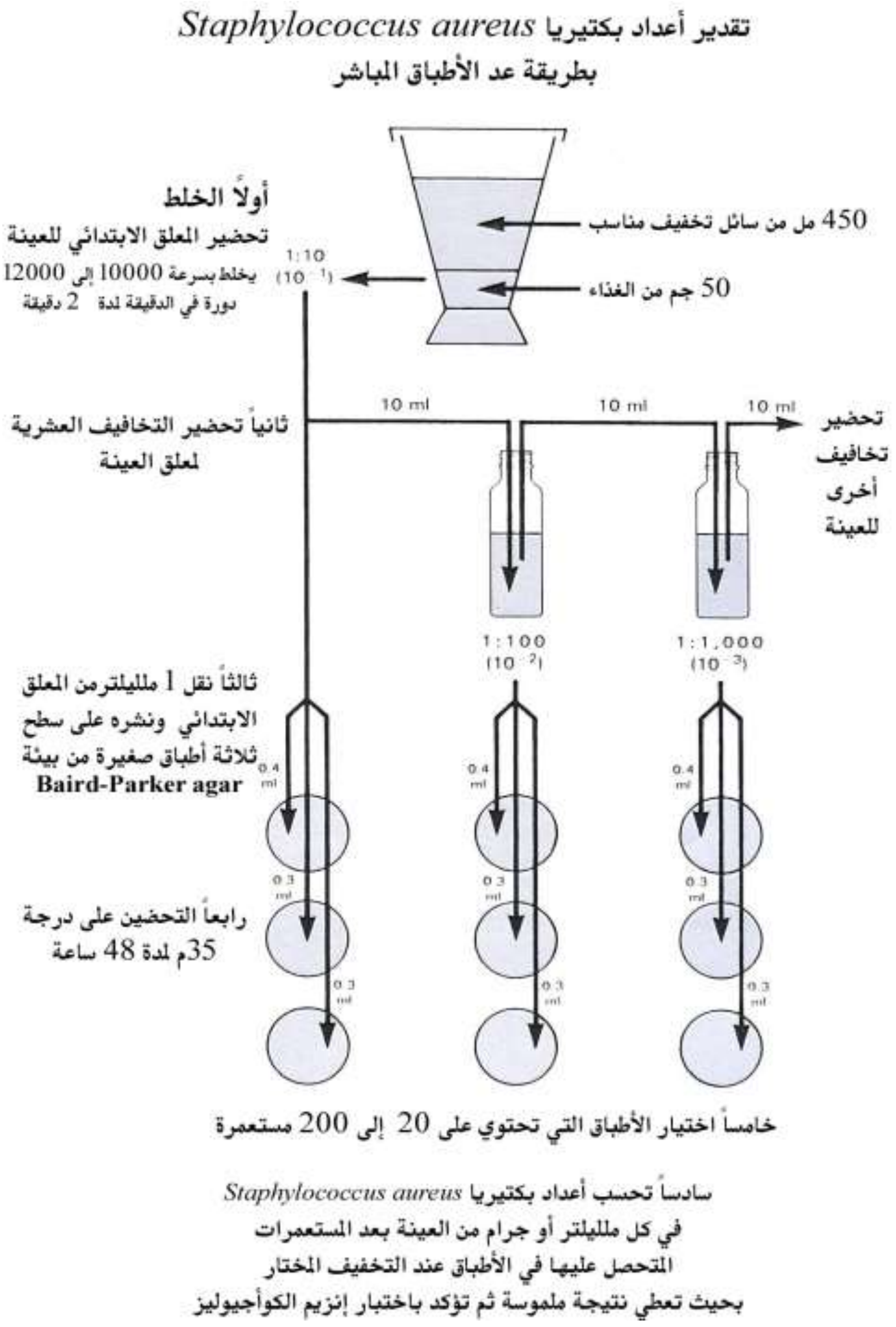
6 - لإجراء الاختبارات التأكيدية (اختبار إنزيم الكوأجيوليز) على المستعمرات النامية، تختار 5 مستعمرات نموذجية و/أو 5 مستعمرات غير نموذجية من كل طبق حسب الحالة (وفي حال سيادة نوع معين من المستعمرات (نموذجية وغير نموذجية) في تخفيفات مختلفة من العينة يحتفظ بأطباق من هذه التخفيفات). أما إذا قل عدد المستعمرات النموذجية و/أو غير النموذجية في الأطباق عن 15 مستعمرة في الأطباق الملحقة من المنتجات السائلة غير المخففة أو من التخفيف الأقل للمنتجات الأخرى فهنا يحتفظ بجميع الأطباق التي تحتوي على أي مستعمرات نموذجية أو غير نموذجية، وتختار جميع هذه المستعمرات لتجري عليها الاختبارات التأكيدية.

7 - لإجراء اختبار إنزيم التخثر (الكوأجيوليز) يؤخذ لقاح من سطح كل مستعمرة مختارة بإبرة تلقيح وينقل إلى أنبوبة أو قارورة بها مستخلص مرق المخ والقلب ويحضن عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 –24 ساعة، ثم يضاف تحت ظروف معقمة 0,1 مليلتر من كل بيئة إلى 0,3 مليلتر من بلازما أرنب في أنابيب معقمة أبعادها 10 × 75 مليمتر أو في قوارير وتحضن عند درجة حرارة 35°م ثم يفحص تجلط البلازما بعد 4 إلى 6 ساعات. يعتبر اختبار الكوأجيوليز إيجابياً إذا كان حجم الجلطة أكثر من ثلاثة أرباع الحجم الأصلي للسائل.

8 - كاختبار ضابط سلبي يضاف 0,1 مليلتر من مستخلص مرق المخ والقلب المعقم إلى 0,3 مليلتر من بلازما الأرنب ويحضن بدون تلقيح ويعتبر الاختبار صحيحاً إذا لم تظهر أية علامات على التجربة الضابطة. وكاختبار ضابط إيجابي يضاف 0,1 مليلتر من مستخلص مرق المخ والقلب المعقمة إلى 0,3 مليلتر بلازما الأرنب ويلقح بسلالة ***Staphylococcus aureus*** قوية موجبة للكوأجيوليز ثم تحضن ويعتبر الاختبار صحيحاً إذا أظهرت علامات تجلط البلازما.

9 - يحسب عدد بكتيريا ***Staphylococcus aureus*** لكل تخفيف في الأطباق التي تحتوي على 20 - 200 مستعمرة نموذجية و/أو غير نموذجية في تخفيفين متتاليين، ويؤخذ المتوسط الحسابي للقيمتين المتحصل عليهما إلا إذا كانت النسبة بين القيمة الكبرى والقيمة الصغرى (وهو ما يعرف بـ **Count ratio**) أكبر من 2 تؤخذ القيمة الصغرى كنتيجة.

الشكل التالي يوضح خطوات الكشف عن بكتيريا ***Staphylococcus aureus*** في الأغذية بطريقة عد الأطباق المباشر **Direct Plate Count**.



الشكل رقم (133): يوضح الكشف عن بكتيريا *Staphylococcus aureus* بطريقة عد الأطباق المباشر، عن (Andrews, 1992).

استخلاص سموم بكتيريا *Staphylococcus aureus* من الأغذية:

يمكن استخلاص سموم بكتيريا *Staphylococcus aureus* من الأغذية وفقاً للطريقة التالية:

1 - يحضر مستخلص الغذاء المشتبه تواجد السم فيه بهرس 100 جرام منه في 500 مليلتر من محلول ملحي تركيزه 0,2 عياري ويضبط الرقم الهيدروجيني عند pH 7,5، في خلاط عالي السرعة لمدة 3 دقائق، يترك الخليط ساكناً لمدة 10 – 15 دقيقة ويعاد فحص الـ pH وتعديله إلى pH 7,5 إذا أقتضى الأمر.

2 - انقل الخليط المهروس إلى قِنِّينتي طرد مركزي من الفولاذ المقاوم للصدى سعة الواحدة 285 مليلتر ويطرد مركزياً على سرعة 16300 × g لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 5°م، (فصل المواد الدهنية لا يكون فعال ما لم يتم الطرد المركزي على درجة حرارة 5°م).

3 - صب السائل المفصول بالطرد المركزي عبر قمع إلى كأس سعته 800 مليلتر خلال شاش دقيق أو مادة ترشيح مناسبة موضوعة في القمع.

4 - أعد استخلاص المواد الصلبة بـ 125 مليلتر من المحلول الملحي بتركيز 0,2 عياري في الخلاط عالي السرعة لمدة 3 دقائق، مع ضبط الرقم الهيدروجيني عند pH 7,5 إذا أقتضى الأمر، وتكرر الخطوتان 2 و 3، واجمع هذا المستخلص مع المستخلص الأول في الكاس.

5 - يوضع السائل المستخلص في كيس الفصل (المِيز) الغشائي Dialysis، ويغمر هذا الكيس في محلول 30 % (وزن/حجم) محلول بولي إيثيلين جليكول Polyethylene glycol (PEG) على درجة حرارة 5°م حتى يقل حجم السائل بمعدل 15 – 20 مليلتر أو أقل (عادة حتى صباح اليوم التالي)، ثم يرفع الكيس من محلول PEG ويغسل بشكل جيد بماء صنبور بارد لإزالة أي أثار من محلول PEG ملتصقة بالكيس. ثم ينقع الكيس بالماء المقطر لمدة 1 – 2 دقيقة بعدها في محلول ملحي تركيز 0,2 عياري لبضعة دقائق. ثم تصب محتويات الكيس في كأس صغير.

6 - يشطف كيس الفصل الغشائي من الداخل بـ 2 – 3 مليلتر من المحلول الملحي 0,2 عياري (بتحريك الأصابع للأعلى والأسفل من الجهة الخارجية للكيس) لإزالة أي أثار ملتصقة من الداخل، وتكرر هذه العملية حتى يصبح الكيس نظيف (باستخدام أقل كمية ممكنة من المحلول).

7 - يضبط الرقم الهيدروجيني للسائل المُجمع عند pH 7,5، ويُجرى له طرد مركزي على سرعة 32800 × g لمدة 10 دقائق ويصب السائل الطافي في مخبار مدرج لقياس الحجم.

8 - أضف السائل المستخلص مع كمية أكبر من الكلوروفورم (ثلاثي كلورو ميثان $CHCl_3$) إلى قمع فصل. رج بقوة بزاوية قائمة لمدة 10 مرات، ثم اجرى لخليط مستخلص الكلوروفورم طرد مركزي على سرعة 16300 × g لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 5°م، ثم أعد طبقات السائل إلى قمع الفصل، ويتم التخلص من طبقة الكلوروفورم من قاع قمع الفصل.

9 - يقاس حجم الطبقة المائية وتخفف بـ 40 ضعف من محلول فوسفات الصوديوم المنظم تركيز 0,005 مول/لتر رقمه الهيدروجيني pH 5,7، ويضبط pH المحلول عند 5,7 باستخدام حمض الفوسفوريك H_3PO_4 تركيز 0,005 مول/لتر، أو فوسفات ثنائي الصوديوم Na_2HPO_4 تركيز 0,005 مول/لتر. ويوضع المحلول المخفف في قمع فصل سعة 2 لتر.

10 - تكون سدادة قمع الفصل موضوعة بشكل غير مُحْكَم طالما وصمام قمع الفصل مغلق، ثم تُشد السدادة بإحكام ويفتح صمام (مِحْبَس) قمع الفصل ليسمح للمحلول المخفف في قمع الفصل أن يترشح خلال عمود من الكَرْبُوكْسِي ميثيل سلولوز Carboxymethylcellulose (CMC) على درجة حرارة 5°م بمعدل 1 – 2 مليلتر/دقيقة بضبط معدل الانسياب بواسطة صمام العمود وبذلك يمكن أن يكتمل الترشيح بتركه حتى صباح اليوم التالي (حيث يعزل السم عن المواد القابلة للذوبان في الغذاء باستخدام مادة CMC كون السم يلتصق بها)، أما إذا لم يترشح كل السائل من العمود خلال هذه الفترة فيوقف تدفق السائل عند وصوله لطبقة الصوف الزجاجي في العمود. وفي حالة ترشح السائل بالكامل خلال المساء وحتى صباح اليوم التالي فيتم إعادة إضافة الماء Rehydrate للعمود بإضافة 25 مليلتر من الماء المقطر.

11 - بعد اكتمال الترشيح يُغسل عمود الكَرْبُوكْسِي ميثيل سلولوز بإمرار 100 مليلتر من محلول فوسفات الصوديوم المنظم تركيز 0,005 مول/لتر بمعدل تدفق مقداره 1 – 2 مليلتر في الدقيقة ويوقف الانسياب عند وصول المحلول لطبقة الصوف الزجاجي في العمود ويتم التخلص من محلول الغسيل هذا.

12 - يستخلص السُم المعوي من عمود الكَرْبُوكْسِي ميثيل سلولوز بـ 200 مليلتر من محلول فوسفات الصوديوم المنظم تركيز 0,05 مول/لتر رقمه الهيدروجيني pH 6,5 بمعدل تدفق مقداره 1 – 2 مليلتر/دقيقة على درجة حرارة الغرفة، ويتم الحصول على الكميات الأخيرة من سائل الاستخلاص المتبقية في العمود بضغط الهواء في قمة العمود.

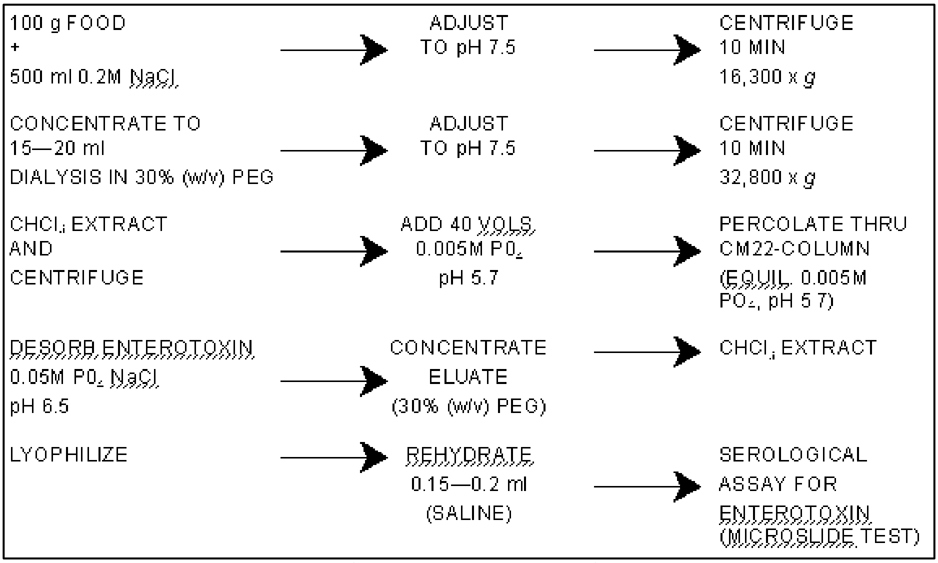
13 - ضع المستخلص في كيس الفصل الغشائي ثم ضع الكيس في محلول PEG 30 % على درجة حرارة 5°م وركزه حتى الجفاف تقريباً، بعدها ارفع الكيس من محلول PEG واغسله، وبعدها انقع الكيس بمحلول الفوسفات المنظم تركيزه 0,2 مول/لتر رقمه الهيدروجيني 7,4.

14- تُزال المواد المركزة من الكيس بغسلها 5 مرات بـ 2 – 3 مليلتر من محلول فوسفات الصوديوم المنظم 0,01 مول/لتر pH 7,4 – 7,5. يستخلص المحلول المركز بالكلوروفورم، ويكرر ذلك حتى يتفكك الراسب ويظهر على هيئة اشرطة في الكلوروفورم.

15 - يوضع المستخلص في كيس فصل غشائي قصير (طوله 15 سنتيمتر)، ويوضع في محلول PEG 30 % واتركه حتى ينتهي كل السائل الموجود داخل الكيس (عادة خلال المساء وحتى صباح اليوم التالي)، ثم يرفع الكيس من محلول PEG ويغسل خارجه بماء الصنبور بعدها يوضع في الماء المقطر لمدة 1 – 2 دقيقة.

16 - تزال محتويات الكيس بغسله من الداخل بدفعات (أجزاء) قدرها 1 مليلتر من الماء المقطر بحيث يستخدم حجم أقل من 5 مليلتر، ويوضع ما تم تجميعه في أنبوبة اختبار (18 × 100 مليمتر) أو أي عبوة مناسبة أخرى ويتم تجفيده.

17 - تُذاب عينة الاختبار المجفدة في أقل كمية ممكنة من المحلول الملحي (0,15 – 0,1 مليلتر) ويتم الكشف عن سموم بكتيريا *Staphylococcus aureus* في الأغذية وفقاً لطريقة التعريف المصلية للسموم من خلال الانتشار المزدوج خلال الهلام على الشريحة الزجاجية.



الشكل رقم (134): يوضح مخطط لعملية استخلاص السموم المعوية لبكتيريا *Staphylococcus aureus*، عن (Bacteriological Analytical Manual Online).

الكشف عن سموم بكتيريا *Staphylococcus aureus* من الأغذية:

تستخدم طريقة التعريف المصلية (السيريولوجية) لسموم *Staphylococcus aureus* من خلال الانتشار المزدوج خلال الهلام على شريحة زجاجية صغيرة، وفي هذه الطريقة تستخدم شريحة زجاجية أبعادها (2,54 × 7,62 سنتيمتر) وتجهز هذه الشريحة كالتالي:

1 - تنظف الشريحة جيداً، ثم يلف حولها طبقتين من شريط غير منفذ للماء مع ترك مسافة قدرها 2 سنتيمتر بينهما في منتصف الشريحة.

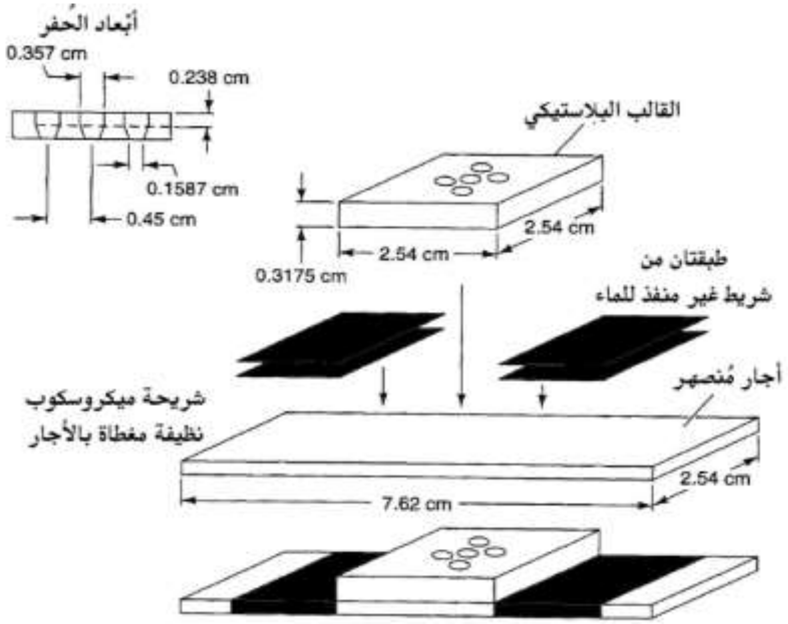
2 - تمسح المسافة بين طبقتي الشريط بالإيثانول وتجفف بقماش نظيف، ثم يغطى سطح هذه المنطقة بالآجار المنصهر (تركيزه 0,2 %)، على أن يصب الآجار ودرجة حرارته 55°م على وجه الشريحة في هذه المنطقة، مع الحرص على توزيعه بشكل متجانس.

3 - يستخدم قالب بلاستيكي خاص (وهو عبارة عن مربع بلاستيكي طول ضلعه 2,54 سنتيمتر وارتفاعه 0,3175 سنتيمتر، به خمس فتحات أو حُفر واسعة من الأعلى قطرها 0,357 سنتيمتر حتى بعمق 0,238 سنتيمتر ثم تضيق من الأسفل بيحث تنتهي بقطر 0,1587 سنتيمتر، والمسافة بين مركز الحُفرة والأخرى 0,45 سنتيمتر)، وتفرد طبقة رقيقة من نوع من الشحم النقي المسمى الشحم السِلِيكُوني Silicone Grease، على السطح السفلي للقالب البلاستيكي من الناحية ذات الفتحات الضيقة.

4 - يُحضر آجار الانتشار (آجار نقي بتركيز 1,2 %)، بإضافته بنسبة 1,2 % إلى سائل يغلي مكون من "0,85 % NaCL + 0,80 % باربيتال صوديوم Sodium Barbital + 10000:1 مرثيولات Merthiolate" ويضبط رقمه الهيدروجيني عند pH 7,4).

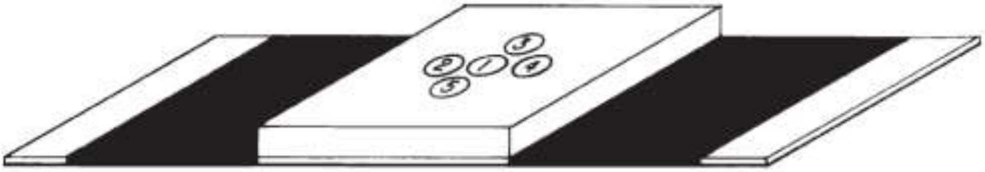
5 - يوضع حوالي 0,4 مليلتر من آجار الانتشار بين طبقتي الشريط غير المنفذ للماء، ثم يوضع بعدها مباشرة القالب البلاستيكي المغطى بالشحم السِلِيكُوني على الآجار الذي يجب أن يكون ما يزال في حالة سائلة، على أن تكون أطراف القالب على حافة طبقتي الشريط غير المنفذ للماء.

6 - بمجرد تصلب الآجار توضع الشرائح في أطباق بتري بها قطع اسفنج مشبع بالماء.



الشكل رقم (135): يوضح طريقة تحضير الشريحة الزجاجية المستخدمة في التعريف المصلي (السيريولوجي) لسموم *Staphylococcus aureus* من خلال الانتشار المزدوج خلال الهلام، عن (Hui, *et al.*, 2001).

7 - توضع في فتحات القالب البلاستيكي بواسطة ماصة باستير تخافيف مناسبة من الأمصال المضادة للسموم المعوية Enterotoxin Antisera، وتخافيف مناسبة من السموم المعوية القياسية (المَرْجِعية) Enterotoxin References، والسم المجهول المستخلص من الغذاء أو من مزرعة البكتيريا وذلك وفقاً لما هو موضح في الشكل المرفق.



النظام الأحادي	النظام الثنائي
1 مصل مضاد لسم البكتيريا (مثل Anti A)	1 تَوْليفَة من الأمصال المضادة للسموم (مثل Anti A و Anti B)
2 التخافيف المحضرة للفحص	2 التخافيف المحضرة للفحص
3 السم المَرْجِعي (مثل النوع A)	3 السم المَرْجِعي (مثل النوع A)
4 التخافيف المحضرة للفحص	4 التخافيف المحضرة للفحص
5 التخافيف المحضرة للفحص	5 السم المَرْجِعي (مثل النوع B)

الشكل رقم (136): يوضح طريقة وضع السموم المعوية المستخلصة ومضاداتها والسموم المَرْجِعية في فتحات القالب البلاستيكي، عن (AOAC International, 2000).

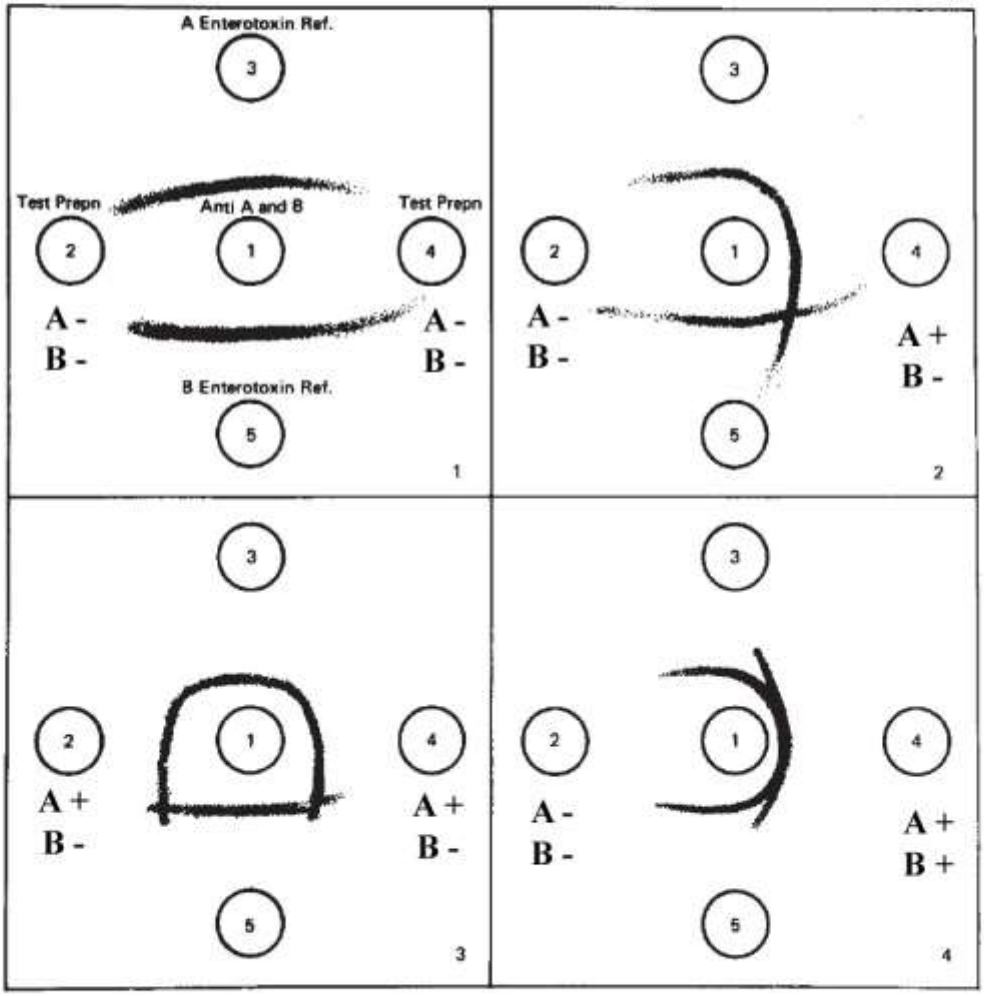
8 - عند وضع السموم المستخلصة ومضادات السموم والسموم المَرْجِعية في فتحات القالب البلاستيكي وفقاً للتكافؤ الأحادي أو التكافؤ الثنائي كما هو موضح بالخطوة السابقة، يراعى أن تزال فقاعات الهواء التي قد توجد في الحُفر بواسطة مزيل الفقاعات (عصيات رفيعة جداً من الزجاج).

9 - تحضن الشرائح الموضوعة في أطباق بتري لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 35°م أو لمدة 48 – 72 ساعة على درجة حرارة الغرفة.

10 - يزال القالب البلاستيكي من الشريحة الزجاجية بعناية شديدة، ثم تنظف الشريحة بواسطة غسلها بعناية في الماء، ثم تغمر في محلول صبغة أحمر الثيازين Thiazine red R (محلول 0,1 % صبغة أحمر الثيازين في 1 % حامض خليك)، لمدة 5 – 10 دقائق.

11 - تفحص الشرائح لوجود خطوط مترسبة Precipitation Lines، حيث تمسك الشريحة (التي تكون خلفيتها معتمة) بزاوية مائلة لمصدر الضوء.

12 - يعتبر امتزاج الخطوط المترسبة للعينة تحت الاختبار مع الخطوط المترسبة للسم المَرْجِعي سواء السم A أو السم B أو كليهما أو أي من الستة أنواع المصلية الأخرى للسم المعوي لبكتيريا *Staphylococcus aureus*. وتفسر النتائج وفقاً لما هو موضح بالشكل التالي:



1 – لا يوجد سم من نوع A أو B لعدم ظهور خطوط ترسيب بين المستخلص المختبر في الحفرتين 2 و 4 مع تَوْليفَة الأمصال المضادة للسموم (Anti A و Anti B) الموضوعة في الحفرة رقم 1 والسموم المَرْجِعية (من النوع A و B) في الحفرتين رقم 3 و 5.

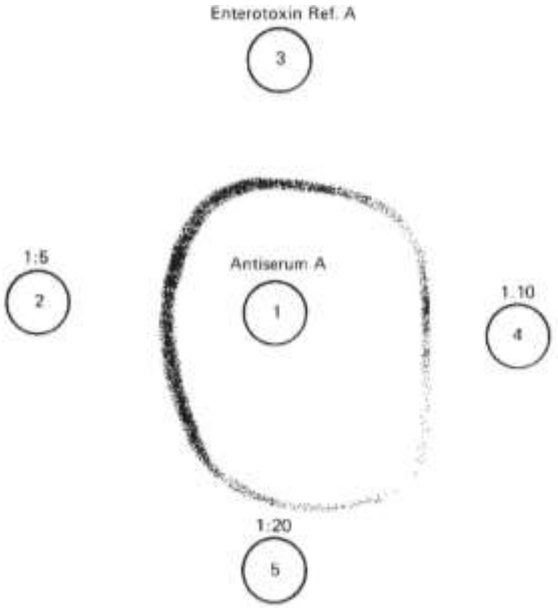
2 – المستخلص الموجود في الحفرة رقم 2 لا يحتوي على سم من نوع A أو B، أما المستخلص الموجود في الحفرة رقم 4 فهو يحتوي على سم معوي من نوع A فقط لظهور خطوط ترسيب بين المستخلص المختبر والسم المَرْجِعي (من النوع A) في الحفرة رقم 3.

3 – المستخلص الموجود في الحفرتين رقم 2 و 4 يحتوي على سم معوي من نوع A فقط لظهور خطوط ترسيب بين المستخلص المختبر والسم المَرْجِعي (من النوع A) في الحفرة رقم 3.

4 – المستخلص الموجود في الحفرة رقم 2 لا يحتوي على سم من نوع A أو B، أما المستخلص الموجود في الحفرة رقم 4 فهو يحتوي على سم معوي من نوع A و B لظهور خطوط ترسيب بين المستخلص المختبر والسموم المَرْجِعية (من النوع A و B) في الحفرتين رقم 3 و 5.

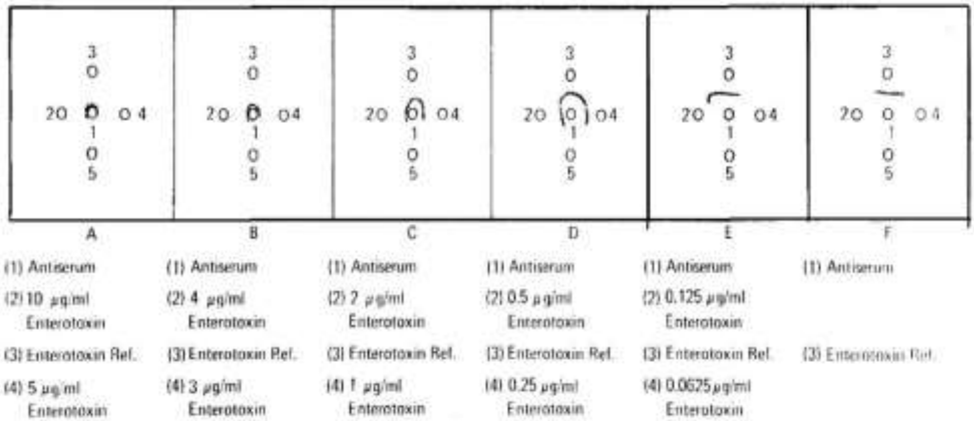
الشكل رقم (137): يوضح تفسير النتائج لاختبار التعريف المصلي لسموم *Staphylococcus aureus* من خلال الانتشار المزدوج خلال الهلام وفقاً للنظام الثنائي، عن (AOAC International, 2000).

وتتأثر خطوط الترسيب المتكونة بكميات السم في تخافيف المستخلص المختبر والشكل التالي يوضح النتيجة الموجبة لاختبار التعريف المصلي للسم المعوي لبكتيريا *Staphylococcus aureus* من النوع المصلي A بالانتشار المزدوج خلال الهلام وفقاً للنظام الأحادي باستخدام تخافيف مختلفة للمستخلص المختبر وهي 5:1 و 10:1 و 20:1.



الشكل رقم (138): يوضح النتيجة الموجبة لاختبار التعريف المصلي لسم *Staphylococcus aureus* نوع A بالانتشار المزدوج خلال الهلام وفقاً للنظام الأحادي، عن (AOAC International, 2000).

أما الشكل التالي فيوضح تأثير كميات السم في تخافيف المستخلص المختبر على تطور خطوط الترسيب بين المستخلص والسم المَرْجِعي.



الشكل رقم (139): يوضح تأثير كميات السم في تخافيف المستخلص المختبر على تطور خطوط الترسيب بين المستخلص والسم المَرْجِعي في النظام الأحادي، عن (AOAC International, 2000).

عزل وتشخيص بكتيريا *Bacillus cereus* في الأغذية:

الأساس في عزل وتشخيص بكتيريا *Bacillus cereus* يتمثل في تلقيح سطح بيئة Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP) في طبقين متماثلتين بكمية محددة من العينة المختبرة في حالة المنتجات السائلة أو بكمية محددة من المعلق الابتدائي للعينة في حالة المنتجات الصلبة، ويتم التلقيح تحت نفس الظروف باستعمال التخفيفات العشرية للعينة أو للمعلق الابتدائي، وذلك كالتالي:

1 - ينقل إلى كل من طبقي الآجار 0,1 مليلتر من عينة الاختبار بواسطة ماصة معقمة في حالة المنتجات السائلة أو 0,1 مليلتر من المعلق الابتدائي (تخفيف 10^{-1}) للعينة في حالة المنتجات الصلبة وتكرر الخطوات للحصول على التخفيف 10^{-2} والتخفيفات الأعلى إذا لزم الأمر.

2 - إذا كان المطلوب تقدير الأعداد القليلة من بكتيريا *Bacillus cereus* في منتجات معينة، يمكن زيادة حساسية الكشف عشرة أضعاف وذلك بالتلقيح بـ 1 مليلتر من عينة الاختبار إذا كانت سائلة أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي في المنتجات الصلبة، ثم يوزع اللقاح على سطح ثلاثة أطباق أجار صغيرة (90 مليمتر)، بكميات 0,3 و 0,3 و 0,4 مليمتر في كل طبق، (وفي هذه الحـــــالة تعامل الأطباق الثلاثة كطبق واحد في جميع الإجراءات التأكيدية والإحصائية التالية لذلك)، كما يتم استخدام تكرارات مزدوجة باستعمال ستة أطباق صغيرة.

3 - ينشر اللقاح بحذر وبأسرع ما يمكن على سطح طبق الآجار وباستعمال قضيب زجاجي على شكل حرف L مع تجنب ملامسة جوانب الطبق ويستعمل قضيب زجاجي معقم لكل طبق. وتغطى الأطباق وتترك لتجف لمدة حوالي 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة. تقلب الأطباق المجهزة ثم تحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 18 – 24 ساعة، اذا لم تكن المستعمرات مرئية بوضوح، تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة أخرى.

4 - بعد التحضين تُختار الأطباق ويفضل أن تكون من تخفيفين متتاليين بحيث يحتوي كل طبق على أقل من 200 مستعمرة.

5 - تعد المستعمرات المحتملة لبكتيريا *Bacillus cereus* في كل طبق، وتميز المستعمرات المحتملة بأنها كبيرة وردية اللون (دلالة على عدم حدوث تخمر للمانيتول) وتحاط بمنطقة ترسيب (دلالة على انتاج الليسيثينيز)، مع أخذ الاعتبار بأنه اذا احتوت الأطباق على عددٍ كبير من الكائنات البكتيريا المخمرة للمانيتول فإن فإن اللون الوردى المميز لمستعمرات بكتيريا *Bacillus cereus* قد يختزل أو يختفي تماماً، كما أن بعض سلالات بكتيريا *B.cereus* قد تنتج كميات قليلة من إنزيم الليسيثينيز أو قد لا تنتجه بالمرة ومثل هذه السلالات لا تُحاط بمنطقه ترسيب، لذا يجب ان تخضع هذه المستعمرات أيضاً للاختبارات التأكيدية.

6 - ولإجراء الاختبارات التأكيدية تختار خمس مستعمرات محتمله من كل طبق تم اختياره وفي حالة وجود أقل من 5 مستعمرات في الطبق، تؤخذ كل المستعمرات المحتملة الموجودة، ويجرى التأكد من هذه المستعمرات كما هو موضح في الفقرات رقم 8 و 9 و 10.

7 - في حالة ازدحام الأطباق وعدم إمكانية اختيار مستعمرات مفصولة بـــــوضوح، يتم تخطيط 5 مستعمرات محتملة على سطح أطباق من بيئة MYP ثم تحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 18 – 24 ساعة، ويُختار من كل طبق على الأقل مستعمرة واحدة واضحة الانفصال وذات لون وردي. ثم يجرى التأكد من هذه المستعمرة كما في الفقرة التالية:

8 - تُلقح المستعمرات المختارة باستخدام إبرة الوخز المستقيمة في منتصف أنابيب حاوية على بيئة أجار الجلوكوز مسخنة حديًثا ثم تحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، وظهور لون أصفر في كل الأنبوبة دلالة على ايجابية التفاعل.

9 - تُلقح المستعمرات المختارة في أنابيب تحتوي على بيئة فوجس – بروسكاور ثم تحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، وينقل من كل أنبوبة 1 مليلتر من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة لاختبار الأسيتيل ميثيل كاربينول، ويعتبر التفاعل موجباً في حالة تكون لون وردي ارجواني . أما إذا كان التفاعل سالباً فيعاد تحضين أنابيب بيئة فوجس – بروسكاور الملقحة لمدة 24 ساعة ثم تُختبر مرة ثانية للكشف عن وجود الأسيتيل ميثيل كاربينول. ويجب أن تكون جميع الأنابيب موجبة ماعدا نسبة لا تتجاوز 5 % من الأنابيب الخاضعة للفحص.

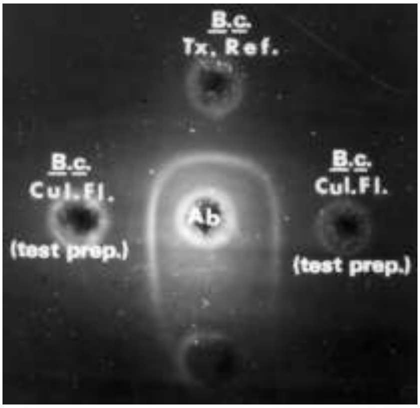
10 - تُلقح المستعمرات المختارة في أنابيب تحتوي على بيئة النترات ثم تحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، ثم تختبر للتأكد من اختزال النترات الى النتريت، حيث يدل تكون اللون الأحمر على اختزال النترات إلى النتريت. أما اذا لم يتكون لون أحمر خلال 15 دقيقة فيضاف (في كبينة الغازات) كمية صغيرة من مسحوق الخارصين وتترك لمدة 10 دقيقة فإذا تكون لون احمر بعد إضافة مسحوق الخارصين دلَّ على أن اختبار التأكد سالب وإذا لم يتكون لون أحمر فإن اختبار اختزال النترات الى النتريت يعتبر موجب.

11 - يحسب عدد بكتيريا *B. cereus* لكل تخفيف في الأطباق التي تحتوي على 20 - 200 مستعمرة نموذجية و/أو غير نموذجية في تخفيفين متتاليين، ويؤخذ المتوسط الحسابي للقيمتين المتحصل عليهما إلا إذا كانت النسبة بين القيمة الكبرى والقيمة الصغرى (وهو ما يعرف بـ Count ratio) أكبر من 2 تؤخذ القيمة الصغرى كنتيجة.

ملحوظات مهمة:

1 - قد يكون الكشف عن البكتيريا أحياناً صعباً نتيجة نمو بكتيريا *Proteus* حيث أنها عند نموها تغطي بكتيريا *B. cereus*، وعند ذلك يمكن إضافة 1 مليلتر من الإيثانول تركيزه 96 % فوق البيئة وتركه يتبخر في الحاضنة أو بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم في البيئة الى 1,5 %.

2 - يمكن الكشف عن سموم بكتيريا *B. cereus* بنفس الطريقة المتبعة مع سموم بكتيريا *Staphylococcus aureus*، (طريقة التعريف المصلية من خلال الانتشار المزدوج خلال الهلام على شريحة زجاجية) والموضحة سابقاً. والشكل التالي يوضح النتيجة الموجبة لاختبار التعريف المصلي لسم *B. cereus* بالانتشار المزدوج خلال الهلام وفقاً للنظام الأحادي.



الشكل رقم (140): النتيجة الموجبة لاختبار التعريف المصلي لسم الإسهال لبكتيريا *B. cereus* بالانتشار المزدوج خلال الهلام وفقاً للنظام الأحادي، عن (Bacteriological Analytical Manual Online).

3 - إن الخصائص الكيميوحيوية التأكيدية لبكتيريا *B. cereus* (كما يوضح ذلك الجدول التالي) تشترك مع *B. cereus* var. *mycoides* و *B. thuringiensis* و *B. anthracis*، والتمييز بين هذه الأنواع يعتمد على ووجود بلورات السم في *B. thuringiensis*، وتحَلل كريات الدَّم الحمراء (*B. cereus* تحلل كريات الدم أمـــا *B. anthracis* لا)، كما أن النمو شبه الجدري يميز *B. cereus* var. *mycoides* عن *B. cereus*.

جدول رقم (10) الخصائص المميزة للأنواع الشائعة من بكتيريا جنس *Bacillus*.

الخصائص	*B. cereus*	*B. mycoides**	*B. anthracis*	*B. thuringiensis*
انزيم الكتاليز	+[a]	+	+	+
الحركة	+/-[b]	-	-[c]	+/-
أختزال النترات	+	+	+	+/-
تحلل التيروسين	+	+/-	-[d]	+
مقاومة اللايسوزايم	+	+	+	+
تفاعل صفار البيض	+	+	+	+
استخدام الجلوكوز لاهوائياً	+	+	+	+
تفاعل فوجس - برسكاور	+	+	+	+
حامض من المانيتول	-	-	-	-
تحَلل كريات الدَّم الحمراء	+	+	-[d]	+
الخصائص المميزة	تسمم غذائي	نمو شبه جدري	معظم السلالات لا تحَلل الدَّم	سم متبلور مصاحب للتجرثم (ممرض للحشرات)

* *B. cereus* var. *mycoides*، (a) 90 – 100 % من السلالات موجبة، (b) 50 % من السلالات موجبة، (c) تعني أن 90 – 100 % من السلالات سالبة، (d) تعني أن معظم السلالات سالبة.

** المصدر Andrews، 1992.

تقدير أعداد بكتيريا *Bacillus cereus* في الأغذية بطريقة العدد الأكثر احتمالاً MPN:

يتم تقدير أعداد بكتيريا *B. cereus* في الأغذية بطريقة العدد الأكثر احتمالاً MPN من خلال الخطوات التالية:

1 - ينقل 1 مليلتر من كل تخفيف من التخفيفات العشرية (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، ...الخ) إلى ثلاثة أنابيب من حساء تربتون الصويا والبوليمكسين Tryptone Soy Polymyxin Broth (TSPB).

2 - تحضن هذه الأنابيب على درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة، وبعد انتهاء فترة التحضين تفحص الأنابيب للتأكد من وجود نمو بكتيري كثيف ومميز لبكتيريا *B. cereus*.

3 - ينقل لقاح بواسطة إبرة زرع من الأنابيب الموجبة إلى زوج من الأطباق تحتوى على بيئة Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP).

4 - تحضن الأطباق بشكل مقلوب على درجة حرارة 30°م لمدة 24 - 48 ساعة، ثم تُفحص الأطباق للتأكد من ظهور مستعمرات بكتيريا *Bacillus*.

5 - تُجرى على المستعمرات الاختبارات التأكيدية التي سبق ذكرها في الفقرات رقم 8 و 9 و 10، ضمن موضوع عزل وتشخيص بكتيريا *Bacillus cereus* في الأغذية (المذكور سابقاً).

6 - يسجل لكل تخفيف من تخفيفات العينة عدد الأنابيب التي أعطت نتيجة إيجابية للاختبارات التأكيدية، وعند استخدام ثلاثة تخفيفات متتالية فقط للعينة يتم تحديد قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN المقابلة لها مباشرة في الجدول، أما عند استخدام أكثر من ثلاث تخفيفات يتم اختيار مجموعة التخفيفات المتتالية المناسبة لتحديد قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN وفقاً للآتي:

أ. يتم اختيار أعلى تخفيف للعينة يحوي على ثلاثة أنابيب إيجابية مع التخفيفين اللذين يليانه مباشرة كما هو موضح في الأمثلة (أ، ب، ج، د في الجدول التالي).

ب. عند وجود تباينات كما هو وارد في المثالين (هـ، و) تضاف قيمة أعلى تخفيف من التخفيفات إلى قيمة التخفيف الأدنى منه مباشرة.

جدول رقم (11) اختيار مجموعة الأنابيب من اجمالي الأنابيب الموجبة التي تم الحصول عليها.

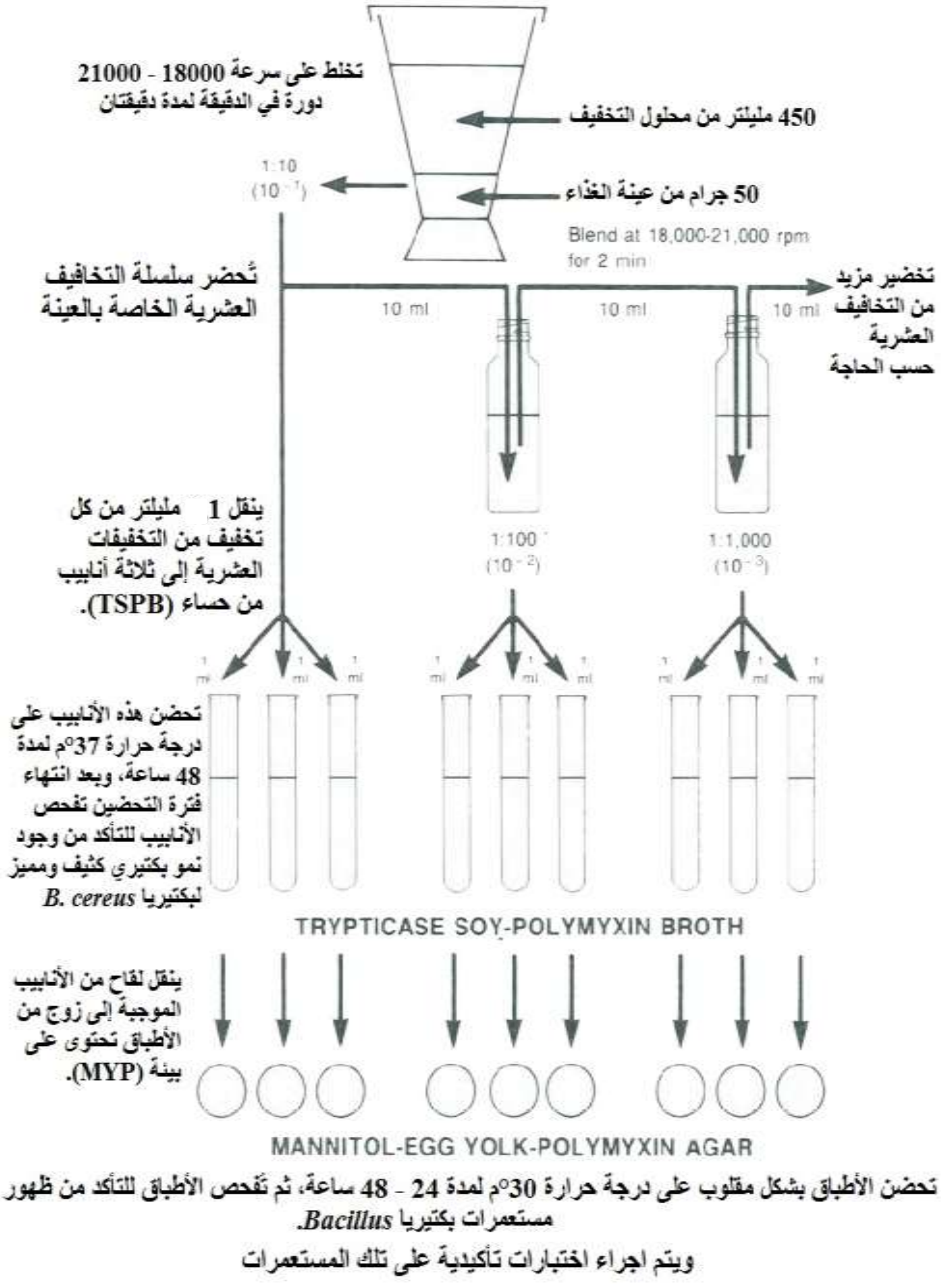
مثال	عدد الأنابيب الموجبة التي تم الحصول عليها من تحضين ثلاثة أنابيب ملقحة من التخفيفات التالية من العينة					مجموعة الأنابيب الإيجابية المختارة	قيمة MPN لكل 1 جرام أو مليلتر من العينة
	مباشرة من العينة السائلة	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}		
أ	3	2	1	0	0	3 - 2 - 1	$14,9 \times 10^{2}$
ب	3	3	2	1	0	3 - 2 - 1	$14,9 \times 10^{3}$
ج	3	2	0	0	0	3 - 2 - 0	$0,33 \times 10^{2}$
د	2	2	0	0	0	2 - 2 - 0	$2,11 \times 10^{2}$
هـ	3	3	2	1	1	3 - 2 - 2	$21,5 \times 10^{3}$
و	3	2	0	1	0	3 - 2 - 1	$14,9 \times 10^{2}$

7 - من خلال الجدول التالي، تحسب قيمة العدد الأكثر احتمالا للبكتيريا الموجودة في 1 جرام أو مليلتر من العينة وفقاً للعلاقة التالية:

(قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN) × (مقلوب أدنى تخفيف من التخفيفات الثلاثة المتتالية للعينة).

جدول رقم (12): حساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 1 مليلتر من العينة، بطريقة الثلاث أنابيب المتسلسلة.

Combination of Positives (1-0.1-0.01 g)	MPN Index per g (ml)
0-0-0	0.00
0-0-1	0.30
0-1-0	0.31
0-1-1	0.61
0-2-0	0.62
1-0-0	0.36
1-0-1	0.72
1-1-0	0.74
1-1-1	1.12
1-2-0	1.14
1-2-1	1.54
2-0-0	0.92
2-0-1	1.43
2-1-0	1.47
2-1-1	2.05
2-2-0	2.11
2-2-1	2.76
2-2-2	3.48
2-3-0	2.86
2-3-1	3.60
3-0-0	2.31
3-0-1	3.85
3-0-2	6.36
3-1-0	4.27
3-1-1	7.49
3-1-2	11.50
3-2-0	9.33
3-2-1	14.90
3-2-2	21.50
3-3-0	24.00
3-3-1	46.20
3-3-2	110.00
3-3-3	>110.00



الشكل رقم (141): يوضح مخطط تقدير أعداد بكتيريا *B. cereus* في الأغذية بطريقة العدد الأكثر احتمالاً MPN، عن (Andrews, 1992).

عزل وتشخيص بكتيريا *Clostridium perfringens* في الأغذية:

تُكوّن بكتيريا *Clostridium perfringens* مستعمرات سوداء مميزة عند تنميتها في بيئة انتقائية هي **Tryptose Sulfite Cycloserine agar (TSC)** نتيجة تحول الكبريتات في هذه البيئة إلى كبريتيت مما يؤدي إلى تلون هذه المستعمرات باللون الأسود. ولذا فإن الأساس في عزل وتشخيص هذه البكتيريا يتمثل في تلقيح أطباق بيئة TSC بكمية محددة من عينات الأغذية السائلة أو كمية محددة من المعلق الابتدائي في حالة الأغذية الصلبة، ويتم مزج اللقاح المنقول مع البيئة (طريقة صب الأطباق) وإضافة طبقة علوية من نفس البيئة (لتوفير ظروف لاهوائية)، كما يتم التلقيح تحت نفس الظروف باستعمال التخفيفات العشرية للعينة أو للمعلق الابتدائي، وذلك كالتالي:

1 - ينقل إلى كل من طبقي بتري 1 مليلتر من عينة الاختبار بواسطة ماصة معقمة في حالة المنتجات السائلة أو 1 مليلتر من المعلق الابتدائي (تخفيف 10^{-1}) للعينة في حالة المنتجات الصلبة، وتكرر الخطوات للحصول على التخفيف 10^{-2} والتخفيفات الأعلى إذا لزم الأمر.

2 - يصب في الطبقين السابقين 12 – 15 مليلتر من بيئة **Tryptose Sulfite Cycloserine** المنصهرة (بدون صفار البيض)، وتحرك الأطباق بلطف لمزج اللقاح مع البيئة بشكل دائري ثم تترك لتتصلب، بعدها يتم إضافة طبقة علوية مقدارها 10 مليلتر من نفس البيئة وتترك أيضاً لتتصلب ثم تنقل إلى وِعَاء التحضين اللاهوائي **Anaerobic Jar** وتحضن لاهوائيا عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 – 24 ساعة، مع الانتباه إلى إن أي زيادة في مدة التحضين يمكن أن تتسبب بزيادة ظهور اللون الأسود في الأطباق (اسوداد الأطباق).

3 - بعد التحضين تُختار الأطباق ويفضل أن تكون من تخفيفين متتاليين بحيث يحتوي كل طبق على أقل من 200 مستعمرة.

4 - تعد المستعمرات المحتملة لبكتيريا *Clostridium perfringens* في كل طبق، ولإجراء الاختبارات التأكيدية تختار خمس مستعمرات محتمله من كل طبق تم اختياره وفي حالة وجود أقل من 5 مستعمرات في الطبق، تؤخذ كل المستعمرات المحتملة الموجودة، ويجرى التأكد من هذه المستعمرات بأحد الاختبارين التأكيديين الموضحين في الفقرات رقم 5 و 6.

5 - في الاختبار التأكيدي الأول تستخدم بيئة كبريتيت اللاكتوز LS، (ويعتبر التفاعل الناتج بعد تحضين هذه البيئة عند درجة حرارة 48°م من الاختبارات المتخصصة لبكتيريا *Clostridium perfringens* و *C. absonum*، ولهذا لا توجد ضرورة للتأكيد على انتقاء

مستعمرات سوداء نقية تماماً عند تلقيح بيئة مرق ثيوجلوكولات ومن ثم بيئة كبريتيت اللاكتوز). ولإجراء هذا الاختبار ينقل لقاح من كل مستعمرة مختارة إلى مرق ثيوجلوكولات Thioglycollate Broth وتحضن البيئة في ظروف لاهوائية عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 – 24 ساعة، وبعد انتهاء مدة التحضين ينقل دون أي تأخير 5 قطرات من مرق ثيوجلوكولات إلى بيئة كبريتيت اللاكتوز بماصة معقمة وتحضن الأنابيب عند درجة حرارة 48°م لمدة 18 – 24 ساعة في حمام مائي، ثم تفحص الأنابيب للتحقق من إنتاج الغاز وظهور لون أسود (راسب من كبريتيت الحديد)، ويعتبر امتلاء ربع أنابيب درهام بالغاز مع ظهور راسب أسود دليلاً على إيجابية هذا الاختبار التأكيدي.

أما عند احتواء أنابيب درهام في البيئة المسودة على كمية من الغاز تقل عن الربع ينقل مباشرة دون أي تأخير 5 قطرات من النمو الظاهر في بيئة كبريتيت اللاكتوز إلى أنبوبة جديدة من نفس البيئة ثم يحضن في حمام مائي عند درجة حرارة 48°م لمدة 18 – 24 ساعة ثم يفحص وفًقا لما هو مبين سابقاً. وهنا تعتبر البكتيريا التي تكون مستعمرات نموذجية في بيئة Tryptose Sulfite Cycloserine وتعطي نتيجة إيجابية لاختبار بيئة كبريتيت اللاكتوز هي بكتيريا *Clostridium perfringens* و تستبعد أي نتيجة أخرى.

6 – في الاختبار التأكيدي الثاني تستخدم بيئة النترات المتحركة Motility Nitrate Medium وبيئة اللاكتوز والجيلاتين Lactose Gelatin Medium، ويتطلب هذا الاختبار مستعمرات نموذجية معزولة وفي حال عدم توفر مستعمرات منفصلة بشكل جيد نتيجة لامتلاء سطح الطبق بالمستعمرات، ينقل لقاح من خمس مستعمرات مميزة إلى مرق ثيوجلوكولات وتحضن في ظروف لاهوائية عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 – 24 ساعة، ثم يتم تخطيط النمو في بيئة الأساس (بيئة Tryptose Sulfite Cycloserine) مع إضافة طبقة علوية مقدارها 10 مليلتر من نفس البيئة وتترك أيضاً لتتصلب ثم تنقل إلى وِعَاء التحضين اللاهوائي Anaerobic Jar وتحضن لاهوائيا عند درجة حرارة 35°م لمدة 20 – 24 ساعة، ثم يتم اختيار مستعمرة مميزة ومعزولة جيداً من كل طبق، ويعاد التخطيط والتلقيح عند الضرورة على أطباق بيئة الأساس TSC حتى الحصول على مستعمرات سوداء مميزة ومعزولة جيداً.

ويتم التحقق من هذه المستعمرات في البيئتين المذكورتين سابقاً وفقاً لما يلي:

أ- <u>التأكيد باستخدام بيئة النترات المتحركة</u>: يتم نقل لقاح بواسطة إبرة التلقيح المستقيمة (بالوخز) من المستعمرات المختارة إلى بيئة النترات المتحركة وتحضن لاهوائيا عند درجة حرارة 35°م لمدة 24 ساعة، ثم تفحص أنابيب بيئة النترات المتحركة عبر خط التلقيح بالوخز ويستدل على الحركة من انتشار النمو بعيداً عن خط الوخز. كما يكشف عن وجود النتريت حيث يؤكد ظهور اللون الأحمر على اختزال النترات إلى نتريت. وفي حالة لم يظهر اللون الأحمر خلال 15 دقيقة فيضاف كمية صغيرة من مسحوق الخارصين وتترك لمدة 10 دقائق فإذا تكون لون احمر بعد إضافة مسحوق الخارصين دلَّ على أن اختبار التأكد سالب وإذا لم يتكون لون أحمر فالاختبار موجب، (يجب أن يُجرى هذا الاختبار في كبينة الغازات).

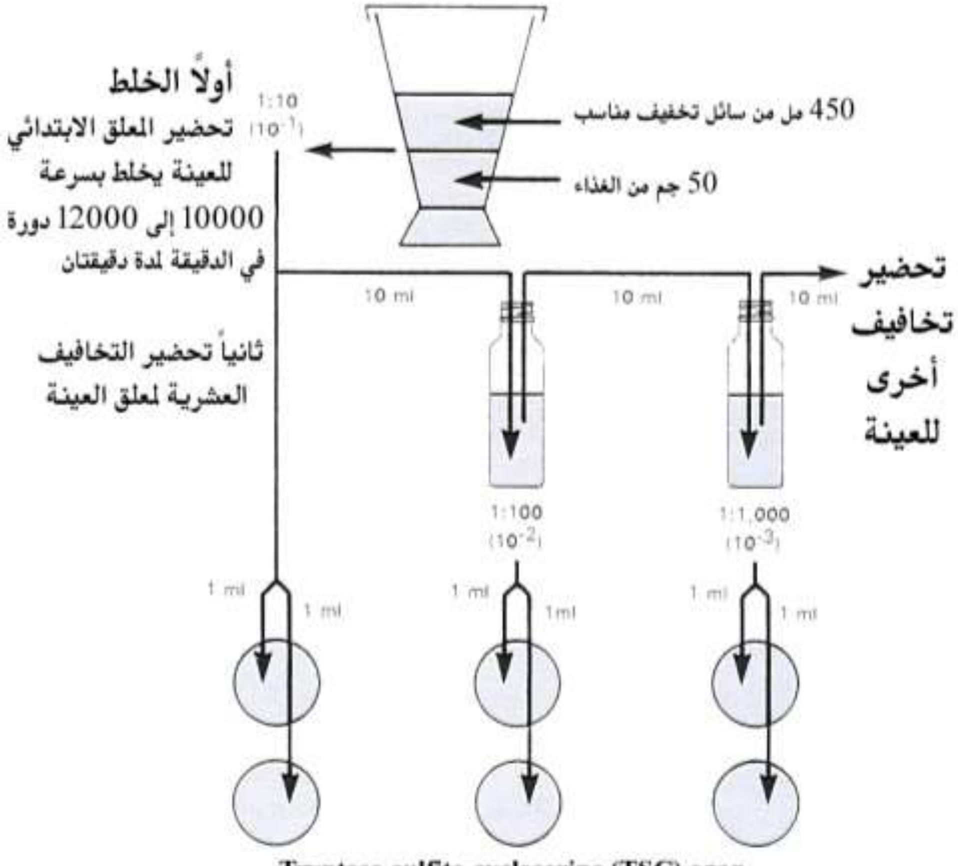
ب- <u>التأكيد باستخدام بيئة اللاكتوز والجيلاتين</u>: ينقل لقاح من المستعمرات المختارة التي تم تنقيتها إلى بيئة اللاكتوز والجيلاتين وتحضن لاهوائيا عند درجة حـــرارة 35°م لمدة 24 ساعة، ثم تفحص أنابيب بيئة اللاكتوز والجيلاتين للتحقق من وجود غاز وظهور لون أصفر (ناتج عن تكون الحامض) كدليل على تخمر اللاكتوز، تبرد الأنابيب لمدة ساعة عند درجة حرارة 5°م ثم تختبر لحدوث تميع للهلام (الجيلاتين)، فإذا حافظت البيئة على صلابتها يعاد حضن الأنابيب لمدة 24 ساعة أخرى ثم تختبر مرة أخرى للتحقق من تميع الهلام.

تعتبر المستعمرات السوداء النموذجية على بيئة **Tryptose Sulfite Cycloserine** والتي تكون غير المتحركة والتي ترجع النترات إلى نتريت وتنتج حامض وغاز في بيئة اللاكتوز ولها القدرة على تميع الهلام خلال 48 ساعة، هي مستعمرات بكتيريا ***Clostridium perfringens***، أما الأنابيب التي تظهر تفاعل ضعيف في اختبار النترات (لون وردي) تستبعد لأن بكتيريا ***Clostridium perfringens*** تعطي تفاعل قوي وسريع.

7 - يحسب عدد بكتيريا ***Clostridium perfringens*** لكل تخفيف في الأطباق التي تحتوي على 20 - 200 وفقاً للمعادلة التالية: $\text{ع} = \frac{\text{مج}}{\text{ح} \times (\text{ع}1 \times 0,1\ \text{ع}2) \times \text{ت}}$.

حيث أن مج = مجموع المستعمرات المميزة في جميع الأطباق، ح = حجم اللقاح المستخدم في كل طبق (بالمليمتر)، ع1 = عدد الأطباق المحتفظ بها من التخفيف الأول. ع2 = عدد الأطباق المحتفظ بها من التخفيف الثاني. ت = عامل التخفيف طبقا للتخفيف الأول.

تقدير أعداد بكتيريا *Clostridium perfringens*



ثالثاً- يصب في الأطباق 12 إلى 15 مليلتر من البيئة وتحرك الأطباق بلطف لمزج اللقاح مع البيئة ثم تترك لتتصلب وبعدها يتم إضافة طبقة علوية مقدارها 10 مليلتر من نفس البيئة وتترك لتتصلب

رابعاً- تحضن لاهوائيا عند درجة حرارة 35م لمدة 20 إلى 24 ساعة

خامساً- تُختار الأطباق التي تكون حاوية على ما بين 20 إلى 200 مستعمرة

سادساً- تُختار خمس مستعمرات نموذجية من الأطباق ذات التخافيف المناسبة وتنقل إلى بيئة مرق ثيوجلوكولات

سابعاً- تُجرى الاختبارات الكيميوحيوية التاكيدية للمستعمرات النموذجية المختارة من الأطباق

الشكل رقم (142): يوضح تقدير أعداد بكتيريا *Clostridium perfringens*، عن (Andrews, 1992).

عزل وتشخيص بكتيريا السالمونيلا *Salmonella* في الأغذية:

لعزل وتشخيص بكتيريا السالمونيلا في الأغذية هناك أربع مراحل متتالية هي:

1 - مرحلة التمهيد للنمو: وفيها يتم الإكثار المبدئي Pre-enrichment للبكتيريا في بيئة إغنائية سائلة، وهي عملية ضرورية لتنشيط الخلايا الضعيفة من بكتيريا السالمونيلا. وفي هذه المرحلة تلقح بيئة الإكثار المبدئي (وغالباً إما أن يستخدم مـاء البيتون المنظم Buffered Peptone Water "المستخدم أيضًا كمحلول تخفيف" أو بيئة مرق اللاكتوز Lactose broth) بعينة الغذاء المراد الكشف عن بكتيريا السالمونيلا فيه. حيث يتم إضافة 25 جرام من عينة الغذاء إلى 225 مليلتر من بيئة الإكثار المبدئي السائلة ثم تخلط بسرعة 10000 إلى 12000 دورة في الدقيقة لمدة دقيقتان وتحضن عند 35°م لمدة 24 ساعة.

2 - الإكثار على بيئات انتقائية سائلة: وهنا ينقل لقاح قدره 10 مليلتر من المزرعة المتحصل عليها في مرحلة التمهيد للنمو إلى دورق يحتوى على 100 مليلتر من كل من بيئتين انتقائيتين هما بيئة التتراثيونات Tetrathionate (TT) Broth التي تحضن في حمام مائي عند 43°م لمدة 24 ساعة (وهذه البيئة مفيدة في حالة الأغذية ذات الحمولة الميكروبية العالية)، وبيئة السلينيت سيستين Selenite Cystine (SC) Broth التي تحضن عند 35°م لمدة 24 ساعة (وهذه البيئة مفيدة في حالة الأغذية ذات الحمولة الميكروبية المنخفضة). ويتم استخدام هذه البيئات الانتقائية للسالمونيلا كونها قد تتواجد في العينات بأعداد قليلة وتكون أيضاً مصحوبة بأعداد كبيرة من البكتيريا المنتمية لعائلة *Enterobacteriaceae* وأنواع أخرى من البكتيريا.

3 - التنمية على بيئات انتقائية تفريقية صلبة: وتتم هذه الخطوة بهدف التعرف على المستعمرات النموذجية لبكتيريا السالمونيلا، حيث يتم تلقيح ثلاث بيئات انتقائية تفريقية صلبة هي Bismuth Sulfite (BS) agar و Hektoen Enteric (HE) agar وكذلك بيئة Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) agar بواسطة ابرة التلقيح ذات الحلقة من النمو المتحصل عليه كل بيئتي TT Broth و SC Broth وتحضن جميع الأطباق المخطوطة من البيئتين السابقتين عند درجة حرارة 35°م لمدة 24 – 48 ساعة. وبعد تلك الفترة تفحص الأطباق المخطوطة للتعرف على وجود المستعمرات النموذجية لبكتيريا السالمونيلا فيها، حيث تكون المستعمرات النموذجية في بيئة (BS) agar بُنية رمادية او سوداء وفي بعض الأحيان تمتلك هذه المستعمرات لمعان فلزي، تحاط البيئة بلون بني في البداية ثم يتحول إلى الأسود بزيادة وقت التحضين. وفي بيئة (HE) agar فتكون

المستعمرات النموذجية ذات لون أخضر مزرق إلى أزرق مع (أو بدون) مركز اسود نتيجة لتكون كبريتيد الهيدروجين H_2S. وعدد من مزارع السالمونيلا تُنتج مستعمرات كبيرة ذات مركز أسود لامع أو قد تظهر كمستعمرات سوداء تقريباً. أما في بيئة (XLD) agar فتكون المستعمرات النموذجية بلون وردي بدون مركز اسود لكن عدد من المستعمرات قد تظهر كبيرة لامعة ذات مركز اسود، كما أن عدد من مزارع السالمونيلا تُنتج أيضاً مستعمرات كبيرة ذات مركز أسود لامع أو قد تظهر كمستعمرات سوداء تقريباً. وفي حالة النمو الضعيف أو عدم وجود مستعمرات نموذجية للسالمونيلا يعاد تحضين الأطباق عند 35°م لمدة 20 – 24 ساعة ثم ويعاد فحص الأطباق للتأكد من وجود مستعمرات نموذجية للسالمونيلا.

4 - <u>مرحلة الاختبارات التأكيدية</u>: عند ظهور مستعمرات نموذجية للسالمونيلا يتم اختيار خمس مستعمرات نموذجية أو محتمله من كل طبق تم اختياره وفي حالة وجود أقل من 5 مستعمرات في الطبق تؤخذ كل المستعمرات المحتملة الموجودة وتلقح في بيئتي أجار الحديد والسكر الثلاثي TSI agar وأجار اللايسين والحديد Lysine Iron (LI) agar، وهذه البيئات تُحضر على هيئة أجار مائل ولذا تلقح بواسطة ابرة التلقيح المستقيمة بالوخز في العمق والتخطيط على السطح، ثم تحضن أنابيب بيئة TSI agar الملقحة عند درجة حرارة 35مْ لمدة 24 ساعة أما أنابيب بيئة LI agar الملقحة فتحضن أيضاً عند درجة حرارة 35مْ لكن لمدة 48 ساعة.

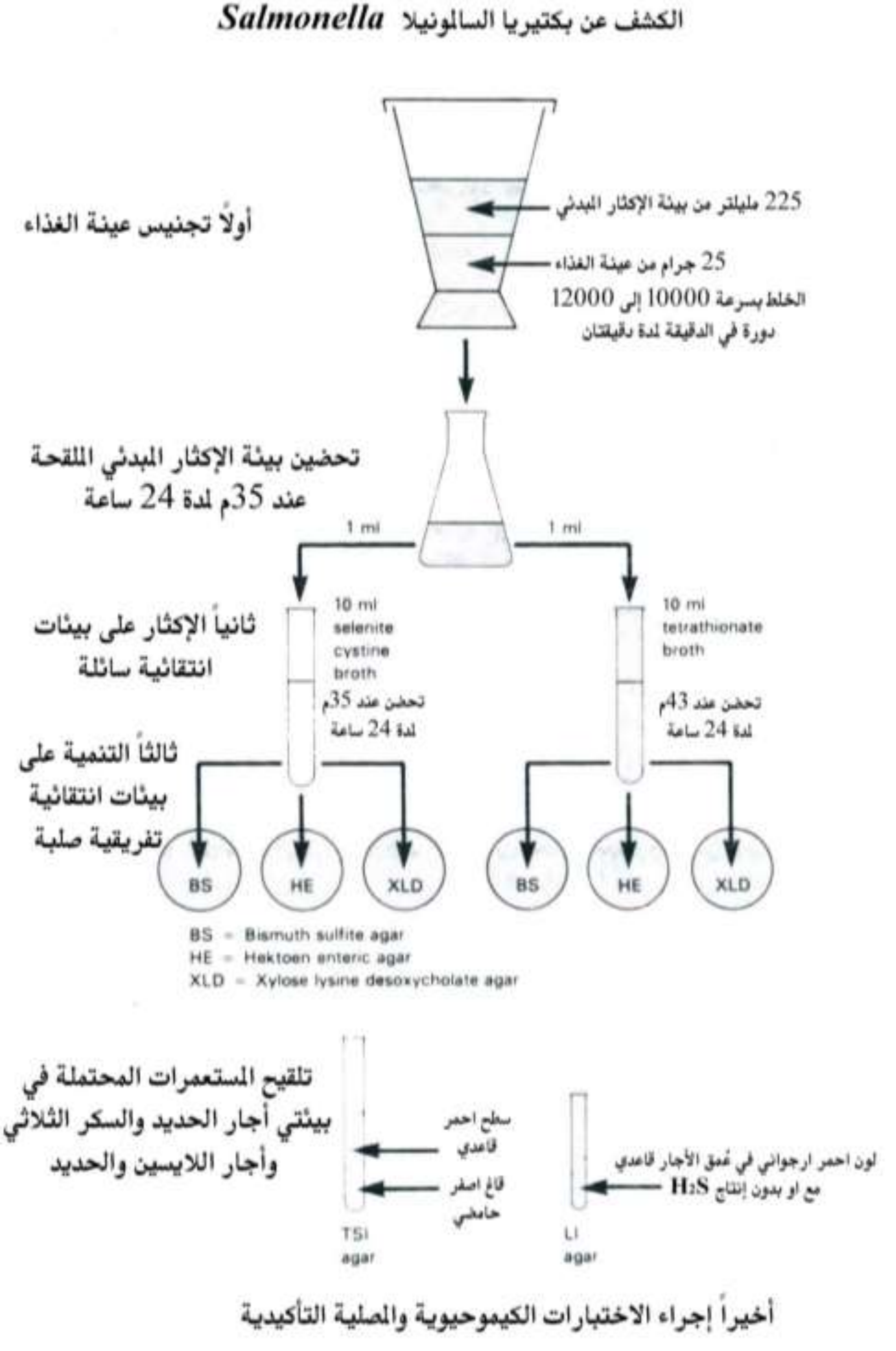
- ✓ تُعطى مستعمرات السالمونيلا النموذجية الملقحة في بيئة TSI agar لون احمر (قاعدي) على السطح المائل ولون اصفر (حامضي) في عُمق الآجار مع او بدون إنتاج H_2S، وذلك في حالة أنواع السالمونيلا غير المخمرة لسكر اللاكتوز، أما أنواع السالمونيلا المخمرة لسكر اللاكتوز (على الرغم من قلتها) فيكون لون السطح المائل أصفر ولون عُمق الآجار أيضاً أصفر (ولذلك لا يجب الاعتماد على نتائج النمو في بيئة TSI agar).
- ✓ أما بيئة LI agar الملقحة فتُعطى مستعمرات السالمونيلا النموذجية لون احمر ارجواني (قاعدي) في عُمق الآجار (نتيجة نزع الكربوكسيل من اللايسين)، واغلب مستعمرات السالمونيلا في هذه البيئة تنتج H_2S. أما المستعمرات التي لا تنتمي لبكتيريا السالمونيلا فيكون لون عُمق الآجار أصفر (حامضي) وهذا يؤخذ بعين الاعتبار كنتيجة سلبية، حتى وإن كان لون السطح المائل أحمر قرميدي.
- ✓ في حال الحصول على نتيجة إيجابية من البيئتين التأكيديتين السابقتين يتم الاحتفاظ بالأنابيب التي أعطت نتيجة إيجابية لإجراء الاختبارات الكيميوحيوية والمصلية (السيرولوجية).

جدول رقم (13) يُلخص الاختبارات الكيميوحيوية والمصلية التي تُجرى على المزارع

الاختبار أو البيئة	طبيعة النتائج		نتيجة [a] السالمونيلا
	الإيجابية (+)	السلبية (-)	
Glucose (TSI)	K/A	K/K أو A/A	+
Lysine decarboxylase LIA	عُمق الآجار أرجواني	عُمق الآجار أصفر	+
H_2S (TSI and LIA)	اسوداد في البيئة	لا يتكون لون اسود	+ أو -
Urease	لون ارجواني محمر	لون أصفر	-
Lysine decarboxylase broth	لون أرجواني	لون أصفر	+
Phenol red dulcitol broth	لون أصفر و/أو غاز	لون أحمر بدون غاز	+[b]
KCN medium	نمو	عدم وجود نمو	-
Malonate broth	لون أزرق	عدم تغير اللون	-[c]
Indole test	سطح بنفسجيّ اللون	سطح أصفر اللون	-
Polyvalent flagellar test	ظهور تلبد	عدم تكون تلبد	+
Polyvalent somatic test	ظهور تلبد	عدم تكون تلبد	+
Phenol red lactose broth	لون أصفر و/أو غاز	لون أحمر بدون غاز	-[c]
Phenol red sucrose broth	لون أصفر و/أو غاز	لون أحمر بدون غاز	-
Voges-Proskauer teste	لون أحمر - وردي	عدم تغير اللون	-
Methyl red test	لون أحمر منتشر	لون أصفر منتشر	+
Simmons citrate	نمو – لون أزرق	لا نمو – لون أخضر	V

(a) في حال الرمز + فذلك يعني أن 90 % أو أكثر تعطي نتيجة موجبة خلال يوم أو يومين.
في حال الرمز - فذلك يعني أن 90 % أو أكثر تعطي نتيجة سالبة خلال يوم أو يومين.
في حال الرمز V فذلك يعني أن النتائج المُتحصل عليها من بكتيريا السالمونيلا متباينة.
(b) في الأغلب *S.enterica* subsp. *arizonae* سالبة و (c) في الأغلب *S.enterica* subsp. *arizonae* موجبة.
حيث إن بكتيريا *S.enterica* subsp. *arizonae* قد تعطي في اختبار اللاكتوز نتيجة موجبة أو سالبة، ولكنها دائمًا في اختبار البيتا جلكتوسيديز تعطي نتيجة موجبة

✓ إما عند إجراء الاختبارات التأكيدية لبكتيريا السالمونيلا باستخدام الأمصال فيجري الكشف عن وجود أنواع السالمونيلا المنتجة لمولدات الضد (الأنتيجينات Antigens) O و Vi و H باختبار التلبد الشريحي Slide Agglutination test، مع الحرص على استبعاد السلالات التي تحدث تجمع ذاتي من خلال وضع قطرة واحدة من المحلول الملحي على شريحة زجاجية نظيفة وتنشر هذه القطرة على جزء من المستعمرة المراد اختبارها للحصول على معلق متجانس ثم ترج الشريحة بحرص لمدة 30 – 60 ثانية وتلاحظ النتيجة، وفي حال وجود تجميع بكتيري مميز كثير أو قليل تعتبر هذه السلالة من التي تحدث تجمع ذاتي ويتعذر متابعة الاختبارات المصلية.



الشكل رقم (143): يوضح كيفية الكشف عن بكتيريا *Salmonella* في الأغذية، عن (Andrews, 1992).

جدول رقم (14) يُلخص نتائج الاختبارات المصلية التي تكون على النحو التالي:

الضَرْب المَصْلِي	المجموعة المَصْلِيّة	مولد الضد البدني O	مولد الضد السوطي H Phase 1	مولد الضد السوطي H Phase 2
Salmonella paratyphi A	A	1 و 2 و 12	a	-
Salmonella paratyphi B	B	4 و 5 و 12	b	1 و 2
Salmonella typhimurium	B	1 و 4 و 5 و 12	i	1 و 2
Salmonella paratyphi C	C_1	6 و 7 و Vi	c	1 و 5
Salmonella choleraesuis	C_1	6 و 7	c	1 و 5
Salmonella typhi	D_1	9 و 12 و Vi	d	-
Salmonella enteritidis	D_1	1 و 9 و 12	g و m	-
Salmonella gallinarum	D_1	1 و 9 و 12	Z_{42}	1 و 7

جدول رقم (15) يُلخص تفسير نتائج الاختبارات الكيميوحيوية والمصلية

نتائج الاختبارات الكيميوحيوية	التجمع الذاتي	نتائج الاختبارات المصلية	تفسير النتائج
نتائـــــج نموذجية	لا يوجد	O و Vi و H موجبة	تعتبر هذه العزلات من بكتيريا السالمونيلا
نتائـــــج نموذجية	لا يوجد	O و Vi و H سالبة	قد تكون هذه العزلات من بكتيريا السالمونيلا
نتائـــــج نموذجية	نعم	لم يتم إجراؤها*	
نتائج غير نموذجية	لا يوجد	O و Vi و H موجبة	
نتائج غير نموذجية	لا يوجد	O و Vi و H سالبة	هذه العزلات ليست من بكتيريا السالمونيلا

* نتيجة استبعاد السلالات التي تحدث تجمع ذاتي وتعذر متابعة الاختبارات المصلية

عزل وتشخيص بكتيريا الشيجيلا *Shigella* في الأغذية:

تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا الشيجيلا في الأغذية بزرع العينات في بيئة إغنائية خاصة هي حساء (مرق) الشيجيلا **Shigella broth** المضاف لها المضاد الحيوي **Novobiocin** لجعل الوسط انتقائي، ثم تحصن العينات وتخطط في أطباق بتري حاوية على بيئة ماكونكي **MacConkey agar**. يتم اجراء الاختبارات الكيميوحيوية والمصلية على المستعمرات النموذجية للتأكيد على أنها بكتيريا الشيجيلا ***Shigella* spp.** وذلك كما يلي:

1- يتم توفير بيئة داعمة (إغنائية) لعزل بكتيريا ***Shigella sonnei*** بإضافة 25 جرام من عينة الغذاء إلى 225 مليلتر من بيئة حساء الشيجيلا ***Shigella* broth** المضاف لها المضاد الحيوي **Novobiocin** بنسبة 0.5 ميكروجرام/مليلتر.

2 - يترك المعلق (العينة + البيئة) لمدة 10 دقائق على درجة الغرفة ويرج بشكل دوري، ثم ينقل الجزء الطافي من المعلق إلى دورق مخروطي **Erlenmeyer flask** معقم سعة 500 مليلتر. ويعدل الأس الهيدروجيني للجزء الطافي من المعلق (إذا اقتضى الأمر) إلى pH 7,0 ± 0,2.

3- يحضن الدورق المخروطي في ظروف لاهوائية داخل وعاء التحضين اللاهوائي في حمام مائي على درجة حرارة 44°م لمدة 20 ساعة.

4 - تخضّ محتويات الدورق المخروطي ثم تخطط في أطباق بتري حاوية على بيئة ماكونكي **MacConkey agar**، ثم تحضن على درجة حرارة 35°م لمدة 20 ساعة.

5 - لعزل الأنواع الأخرى من بكتيريا ***Shigella* spp.** فتتبع نفس الإجراءات المذكورة لكن يكمن الاختلاف في أن إضافة المضاد الحيوي **Novobiocin** تكون بنسبة 3 ميكروجرام/مليلتر، كما أن تحضين محتويات الدورق المخروطي في الظروف اللاهوائية تكون على درجة حرارة 42°م لمدة 20 ساعة في الحمام المائي.

6 - تُلقح المستعمرات النموذجية لبكتيريا الشيجيلا (التي تكون وردية ونصف شفافة إلى حَدٍ ما مع أو بدون حافات خشنة) في كل من البيئات التالية (**Glucose broth** و **TSI agar** و **Lysine Decarboxylase broth** و **motility agar** و **Tryptone**) وتحضن على درجة حرارة 35°م لمدة 48 ساعة لكنها تُفحص بعد 20 ساعة من التحضين.

7- تهمل كل المزارع التي تُظهر حركة وتنتج غاز H_2S وتستطيع نزع الكربوكسيل من الحامض الأميني اللايسين وتكون غاز من السكروز أو اللاكتوز. ما فيما يتعلق بتكوين الإندول **Indole**، فتهمل كل العزلات التي تم إغنائها عند 44°م والتي أعطت إيجابية لاختبار الإندول، أما العزلات التي تم إغنائها عند 42°م فمن الممكن أن تعطي نتائج إيجابية أو سلبية مع اختبار الإندول لذا يجب الإحتفاظ بها.

8 - تجرى الاختبارات الكيميوحيوية على عزلات بكتيريا الشيجيلا، وتتلخص خواصها في كونها بكتيريا عصوية سالبة لتصبيغ جرام، غير متحركة، لا تنتج غاز H_2S، لا تستطيع تحليل اليوريا، لا تنتج غاز من تخمر الجلوكوز، لا تستطيع نزع الكربوكسيل من اللايسين، لا تنمو في بيئة حاوية على سيانيد البوتاسيوم **KCN**، لا تخمر السترات، لكنها إيجابية لاختبار الميثيل الأحمر.

9 - تنقل العزلات التي اعطت صفات إيجابية لبكتيريا الشيجيلا إلى أنابيب اختبار حاوية على أجار مائل لبيئة نَقيع لحم العجل **Veal infusion agar slants**، ويتم إجراء الفحوص المصلية عليها للتأكيد على كونها من أنواع بكتيريا الشيجيلا.

عزل وتشخيص بكتيريا *E. coli* O157:H7 في الأغذية:

تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا *E. coli* O157:H7 في الأغذية في التالي:

1- يتم وزن 25 جرام من عينة الغذاء ويضاف إليها 225 مليلتر من بيئة حساء تربتون الصويا المعدل Modified Trypticase Soy Broth (mTSB)، وتجنس العينة ثم تُحضن عند درجة حرارة 41,5°م لمدة 6 ساعات.

2 - ينقل جزء من النمو ويخطط في أطباق حاوية على وسط أجار سيفكسيم تيليورايت ماكونكي السوربيتول Cefixime Tellurite Sorbitol Macconkey agar (CT-SMAC)، ثم تخضن الأطباق عند درجة حرارة 37°م لمدة 18 - 24 ساعة.

3- تفحص المستعمرات النامية على الأطباق وتختار المستعمرات غير المخمرة للسوربيتول (حيث تكون عديمة اللون أو شاحبة مقارنة بالمستعمرات المخمرة التي تكون وردية اللون).

4 - تزرع المستعمرات غير المخمرة للسوربيتول على وسط ماكونكي لغرض استبعاد الأنواع البكتيرية غير المخمرة لسكر اللاكتوز وتحضن عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، ثم تُنتخب المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز يهدف إجراء الاختبارات التشخيصية اللازمة.

5 - يتم أجراء أربع اختبارات كيميوحيوية للعزلات غير المخمرة للسوربيتول والمخمرة لسكر اللاكتوز خاصة بالنمط المصلي *E. coli* O157:H7 لغرض تشخيصه وتفريقه عن باقي الأنماط المصلية من بكتيريا *E. coli*، وهذه الاختبارات الكيميوحيوية هي: تخمر السيلوبايوز Cellobiose fermentation test واختبار النمو بسيانيد البوتاسيوم KCN واختبار MUG (4-methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronide) للكشف عن إنتـــاج إنزيم β-Glocuronidase واختبار إنتاج Enterohemolysin، حيث أن العزلات التي تعطي نتائج سالبة مع جميع هذه الاختبارات ما عدى اختبار انتاج Enterohemolysin يمكن اعتبارها مبدئياً بكتيريا *E. coli* O157:H7.

6 - لتأكيد نتائج الاختبارات الكيميوحيوية وتأكيد أن النوع المصلي هو *E. coli* O157:H7، يتم إجراء اختبار مصلي يدعى تلبد اللَاتِكْس السريع Rapid latex agglutination test، للتحري عن المستضد الجسمي O157 والمستضد السوطي H7.

عزل وتشخيص بكتيريا *Listeria monocytogenes* في الأغذية:

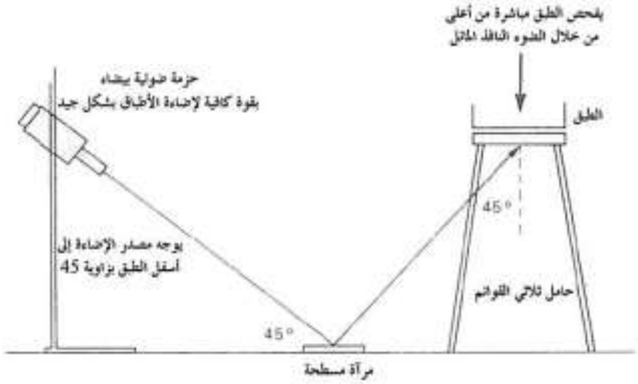
تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا *Listeria monocytogenes* في الأغذية في التالي:

1- يتم وزن 25 جرام من عينة الغذاء ويضاف إليها 225 مليلتر من بيئة حساء اللِّيسْتَرِيًّا الإغنائي *Listeria* Enrichment Broth (LEB)، وتجنس العينة ثم تُحضن عند درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة.

2 - ينقل جزء من النمو ويخطط في أطباق حاوية على بيئة أجار تعريف اللِّيسْتَرِيًّا الأساس *Listeria* Identification Agar Base وأطباق حاوية على بيئة أجار اكسفورد الأساس *Listeria* Oxford Medium Base. تُحضن الأطباق عند درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة للتعرف على المستعمرات النموذجية لبكتيريا *Listeria monocytogenes*.

3 - المستعمرات النموذجية لبكتيريا *Listeria monocytogenes* التي تظهر على كلتا البيئتين الانتقائيتين تتميز بكونها مستعمرات خضراء مع انعكاس رمادي أو زيتي، ذات قطر 1 مليمتر، أحياناً بمركز أسود، ولكن دائماً محاطة بهالة سوداء، وقد تكون المستعمرات بقطر يتراوح بين 1,5 - 2 مليمتر وعندها تتميز بانفراج مركزي وتكون محاطة بهالة سوداء.

4 - تنتقي 5 مستعمرات نموذجية من كل طبق ويتم تخطيطها في اطباق بيئة تربتون الصويا مع مستخلص الخميرة Trypticase soy agar with yeast extract (TSYEA) ثم تُحضن الأطباق عند درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة حتى يمكن وصف المستعمرات النموذجية التي تظهر على شكل مستعمرات محدبة عديمة اللون شفافة ذات حافات منتظمة. ويراعى أن تستخدم طبقة رقيقة من البيئة (15 مليلتر من البيئة) لإجراء اختبار هنري الذي فيه تختبر الأطباق بواسطة استخدام حزمة ضوئية بيضاء وبقوة كافية لإضاءة الطبق جيدًا ويوجه مصدر الإضاءة إلى أسفل الطبق بزاوية 45° ويفحص الطبق مباشرة من أعلى من خلال الضوء النافذ المائل فتظهر مستعمرات اللِّيسْتَرِيًّا بلون أزرق ومحببة السطح.



الشكل رقم (144): اختبار هنري Henry للتعرف على مستعمرات *Listeria spp.* المتوقعة.

5 - يتم اجراء اختبارات تأكيدية إضافية على المستعمرات النموذجية للتأكيد على أنها بكتيريا *Listeria monocytogenes* وتشمل هذه الاختبارات:

أ- الشكل الظاهري وتصبيغ جرام وفيها تظهر بكتيريا *Listeria monocytogenes* عصوية ونحيلة مستقيمة أو محدبة قليلا، موجبة لتصبيغ جرام، تترتب غالبا على شكل أزواج (النهاية مع النهاية وبزاوية حادة) ويمكن أن تشكل في ترتيبها الأحرف الصينية.

ب- اختبار إنزيم الكتاليز وتعطي بكتيريا *Listeria monocytogenes* نتيجة موجبة.

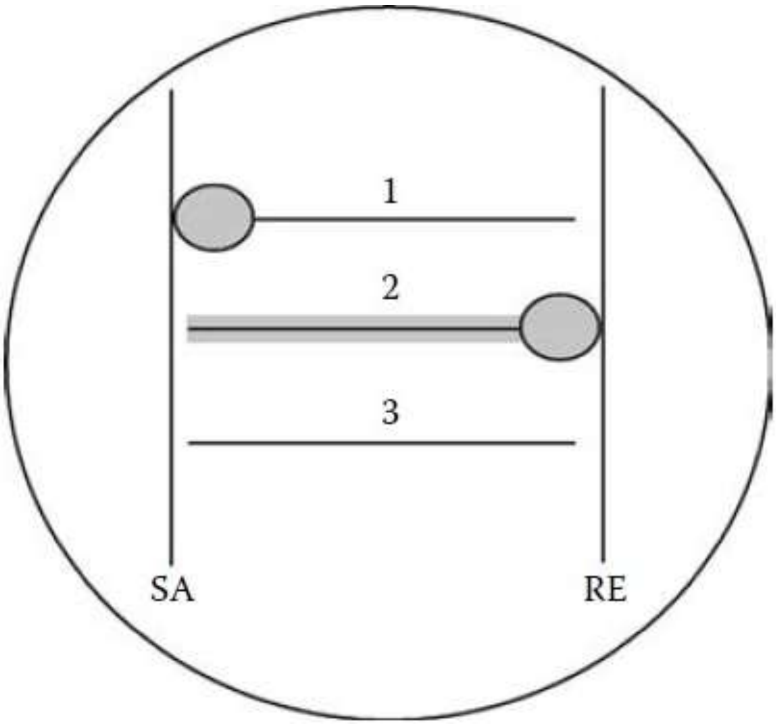
ج- اختبار الحركة على شريحة القطرة المعلقة، وتكون متحركة ذات حركة بطيئة أو حركة دائرية، والمزارع التي تنمو على أعلى من درجة 25°م يمكن أن لا تظهر هذه الحركة.

د- اختبار الحركة بطريقة الوخز في بيئات شبه صلبة وفيها تكون اللِّيسْتَرِيًّا متحركة حول خط التلقيح وإذا أعطت النتيجة سلبية يعاد تحضينها مرة أخرى لمدة 5 أيام إضافية.

هـ - اختبار تحلل الدم، تعطي بكتيريا *Listeria monocytogenes* تحلل للدم من نوع بيتا على بيئة آجار الدم لكنها تشترك في ذلك مع كل من *L. ivanovii* و *L. seeligeri*، وهنا يمكن تميز *L. monocytogenes* عن النوعين الأخرين كونها الوحيدة فيهن التي تخمر سكر الرامْنُوز Rhamnose.

و- اختبار كامب Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) Test، وفيه يستخدم طبق آجار الدم ويخطط بمزارع من *Staphylococcus aureus* (S) و *Rhodococcus equi* (R) بخط لكل منها على أن يكون الخطين متوازيين على طبق الآجار وتخطط المزرعة المختبرة بخط متعامد على الخطين السابقين على ألا يلمس الخطين السابقين كما تخطط مزارع نموذجية من *L. monocytogenes* و *L. innocua* و *L. ivanovii*، تُحضن الأطباق عند درجة حرارة 37°م لمدة 18 - 24 ساعة.

يعطي الاختبار الموجب زيادة في المساحة التي تعطي تحلل دم من نوع بيتا حول خط *S. aureus* و *R. equi*، يعتبر الاختبار إيجابياً لبكتيريا *L. monocytogenes* إذا أعطت العزلة المختبرة تحلل للدم مع *S. aureus* على شكل حلقة مستديرة مساحتها صغيرة في حدود 2 مليمتر ولا تعطي مساحة كبيرة من التحلل على طول خط التلقيح بينما ولا تعطي مساحة تحلل مع *R. equi*. أما *L. ivanovii* فتعطي مع *R. equi* تحلل دم بيتا بمساحة كبيرة تتراوح بين 5 – 10 مليمتر وتكون على شكل رأس سهم كما تعطي مساحة كبيرة من التحلل على طول خط التلقيح، أما إذا كانت مساحة تحلل الدم صغيرة في حدود 1 مليمتر فتعتبر النتيجة سلبية. أما في حالة *L. innocua* فلا تعطي أي تحلل للدم.



الشكل رقم (145): اختبار كامب CAMP لعزلات *Listeria*، 1 - *L. monocytogenes*، 2 - *L. ivanovii*، 3 - *L. innocua* عن (Liu, 2008).

عزل وتشخيص بكتيريا *Yersinia enterocolitica* في الأغذية:

إن عزل وتشخيص بكتيريا *Yersinia enterocolitica* في الأغذية يكون على ثلاثة مراحل هي:

1 - المرحلة الأولى وهي مرحلة الإغناء الأولي وذلك بزرع العينة في كل من:

أ. حساء البيبتون والسوربيتول وأملاح الصفراء **Peptone Sorbitol Bile Broth (PSB)** وذلك بأخذ 25 جرام (أو 25 مليلتر) من العينة مع 225 مليلتر من حساء PSB (أي 10:1)، وتحضينها على درجة حرارة 22° - 25°م لمدة 48 - 72 ساعة مع الرج أو لمدة 5 أيام بدون رج الأنابيب.

ب. حساء الأرجازان والتيكارسلين وكلورات البوتاسيوم **Irgasan Ticarcillin Chlorate Broth (ITC)** وذلك بأخذ 25 جرام (أو 25 مليلتر) من العينة مع 2475 مليلتر من حساء ITC (أي 100:1)، وتحضينها على درجة حرارة 22°م لمدة 48 ساعة.

2 - المرحلة الثانية وهي مرحلة عزل البكتيريا والتعرف عليها من خلال زرع النمو المتحصل عليه من كل من البيئتين السابقتين على أطباق من البيئات التالية:

أ. بيئة متخصصة في عزل *Yersinia* تُدعى *Yersinia* **Selective Agar Base** وتُعرف بأجار سفسولودين أرجازان نوفوبيوسين **Cefsulodin Irgasan Novobiocin (CIN) Agar**، حيث ينقل النمو من حساء (PSB) ويخطط على طبق (CIN)، كما يؤخذ مقدار 0,5 مليلتر من حساء (PSB) ويضاف إلى 4,5 مليلتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم معقم (تركيزه 0,5 %) ويمزج جيداً لمدة 20 ثانية ثم يخطط منه طبق أخر من بيئة (CIN)، ويتم تحضين الأطباق على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، بعدها تُفحص للبحث عن مستعمرات نموذجية لبكتيريا *Yersinia enterocolitica* والتي تتميز بكونها مستعمرات صغيرة (قطرها أصغر أو يساوي 1 مليمتر) ملساء ذات مركز أحمر وتكون أطرافها نصف شفافة، (وفي حال لم يكن هناك أي نمو أو كان هناك نمو ضعيف فتحضن الأطباق لمدة 24 ساعة إضافية ويعاد فحصها مرة أخرى).

ب. بيئة السالمونيلا والشيجلا مع ديوكْسِيكُولاَت الصوديوم وكلوريد الكالسيوم (SSDC) *Salmonella-Shigella* **Desoxycholate Calcium Chloride**. حيث ينقل النمو من حساء (ITC) ويخطط على طبق (SSDC)، ويتم تحضين الأطباق على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، بعدها تُفحص للبحث عن مستعمرات *Yersinia enterocolitica* النموذجية التي تتميز بكونها مستعمرات صغيرة (قطرها أصغر أو يساوي 1 مليمتر) رمادية اللون ذات حواف غير حادة وغير متعرجة ومحببة، (وفي حال لم يكن هناك أي نمو أو كان هناك نمو ضعيف فتحضن الأطباق لمدة 24 ساعة إضافية ويعاد فحصها مرة أخرى).

3 - <u>المرحلة الثالثة</u> مرحلة الاختبارات التأكيدية: والتي تجرى على خمسة مستعمرات نموذجية، أما إذا وجد أقل من خمسة مستعمرات نموذجية فتؤخذ جميعها لأجراء الاختبارات التأكيدية. وتلقح كل من الخمسة مستعمرات على سطح طبق من الآجار المغذي وتحضن على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة. ثم تجرى على تلك المستعمرات الاختبارات التأكيدية التالية:

أ. اختبار إنزيم اليوريز والإندول **Urease and Indole Test:**

تُلقح أنابيب حاوية على حساء اليوريا والإندول **Urea Indole Broth** وتحضن في حمام مائي على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، ويعتبر اختبار إنزيم اليوريز موجب إذا تغيير لون الوسط إلى اللون الوردي المائل للون البنفسجي، في حين أن اللون الأصفر أو البرتقالي يعتبر سالب. كما يتم الكشف عن تكون الإندول بواسطة كاشف كوفاكس **Kovacs' reagent**، وتتمثل النتيجة الموجبة لهذا الاختبار بانفصال طبقة كحولية فوق الطبقة المائية وظهور حلقة من اللون الوردي **Pink** إلى الأحمر في هذه الطبقة وهي دليل وجود الإندول.

ب. اختبار النمو على بيئة اجار كليجلر **Kligler Iron Agar (KIA) growth test:**

تلقّح أنابيب الآجار المائل لبيئة كليجلر **KIA** (الحاوية على تركيز 1 % من سكر اللاكتوز، و 0.1 % من سكر الجلوكوز) بوخز عُمق الآجار بإبرة التلقيح مباشرة وبعد ذلك يتم التخطيط على السطح المائل للبيئة على شكل متعرّج، ثم تحضن الأنابيب الملقحة لمدة تتراوح بين 24 إلى 48 ساعة من أجل اكتشاف وجود تخمر للسكر، وإنتاج للغاز وإنتاج كبريتيد الهيدروجين H_2S. (تخمر بكتيريا ***Yersinia*** الجلوكوز فقط مع عدم تكون غاز أو H_2S). وتسجل التغيرات التي تظهر على البيئة كالتالي:

- عُمق الآجار أصفر (A) والسطح المائل أحمر (K) دلالة على تخمر سكر الجلوكوز فقط.
- عُمق الآجار يكون أحمر (K) والسطح المائل يكون أحمر (K) دلالة على عدم حدوث تخمر لأي من سكري اللاكتوز والجلوكوز.
- عُمق الآجار أصفر (A) والسطح المائل أيضاً أصفر (A) دلالة على تخمر سكر اللاكتوز.
- يتم الاستدلال على تكون غاز من تخمر السكر من خلال تشِقق الآجار أو ارتفاعه عن قاع الأنبوبة. كما يتم الاستدلال على انتاج H_2S من خلال ظهور اللون الأسود في البيئة.

ج. اختبار إنزيم الأكسيديز **Oxidase:**

في هذا الاختبار يجب عدم استخدام الحلقة السلكية الناقلة المصنوعة من النيكل/كروم بل يتم استخدام حلقة سلكية ناقلة مصنوعة من البلاتين/إيريديوم أو قضيب زجاجي، حيث يؤخذ جزء من المستعمرة وتوضع على ورقة نشاف مبللة بكاشف الاكسيديز، وتعتبر النتيجة سلبية إذا لم يتغير اللون إلى البنفسجي أو الأزرق في خلال 10 ثواني.

* المستعمرات كانت نتائجها كالتالي: إنزيم اليوريز (+)، الإندول (+ / -)، تخمر الجلوكوز (+)، تكون غاز من تخمر الجلوكوز (-)، انتاج H_2S (-)، إنزيم الأكسيديز (-)، تخمر اللاكتوز (-)، [مع العلم أنه توجد بعض سلالات نادرة من بكتيريا *Yersinia* تعطي اختبار اللاكتوز إيجابي عند عزلها من منتجات الألبان]؛ تُجرى لها الاختبارات المكملة التالية:

د. اختبار نزع الكربوكسيل من اللايسين والأورنيثين:

تلقح أنبوبة من بيئة **Decarboxylation Medium 0.5% L-Ornithine** وأنبوبة أخرى من بيئة **Decarboxylation Medium 0.5% L-Lysine**، وتغطى الأنبوبتان بحوالي 1 مليلتر من زيت معدني معقم أو بالفاسبار المعقم وتحضنان على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة. وجود عكارة مع ظهور اللون البنفسجي بعد التحضين يدل على أن الاختبار موجب، أما اللون الأصفر فيدل على أن الاختيار سالب. (بكتيريا *Yersinia* تعطي نتيجة سالبة مع اللايسين في حين أنها تعطي نتيجة موجبة مع الأورنيثين)، [مع العلم أنه توجد بعض سلالات نادرة من بكتيريا *Yersinia* تعطي نتيجة سالبة مع الأورنيثين].

هـ. اختبار تخمر سكريات السكروز والرامنوز والترهالُوز والزَّايلُوز:

تُلقح أنابيب من البيئات الحاوية على تركيز 1 % من السكريات المذكورة وتحضن الأنابيب على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة. تغير اللون إلى اللون الأصفر بعد التحضين يدل على أن الاختبار موجب، في حين أن اللون الأحمر يدل على أن الاختبار سالب. [بكتيريا *Yersinia* تعطي النتائج التالية: السكروز (+)، الرامنوز (+ / -)، الترهالُوز (+ / -)، الزَّايلُوز(+ / -)].

و. اختبار استهلاك السترات **Citrate** كمصدر وحيد للكربون:

تُلقح أنابيب أجار مائل من بيئة السيمون سترات **Simmon's Citrate** وتحضن على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة، ويعتبر الاختبار موجب عند تحول لون الوسط الأخضر إلى اللون الأزرق. (بكتيريا *Yersinia* لا تستهلك السترات كمصدر وحيد للكربون).

ز. اختبار التوين إسْتِريز **Tween esterase test**:

تلقح أنابيب أجار مائل من وسط اختبار التوين إسْتِريز، وتحضن أنابيب على درجة حرارة 25°م لمدة 5 أيام، وتُفحص دورياً لملاحظة أي تفاعل إيجابي يتمثل بوجود منطقة غير شفافة نتيجة ترسب بلورات متناهية في الصغر من أُوليئات الكالسيوم (**Calcium Oleate**).

* المستعمرات كانت نتائجها كالتالي: نزع الكربوكسيل من اللايسين (-)،نزع الكربوكسيل من الأورنيثين (+)، تخمر السكروز (+)،تخمر الرامنوز (+ / -)، تخمر الترهالُوز (+ / -)، تخمر الزَّايلُوز (+ / -)، استهلاك السترات (-)، تُجرى عليها الاختبارات الباثولوجية المكملة التالية:

أ. اختبار تخمر الاسكولين Esculin fermentation test:

تُلقح أنابيب أجار مائل من بيئة أجار الصَّفْراءِ و الإِسْكولين Bile Esculin Agar، وتحضن على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة. وتكون النتيجة ايجابية عند ملاحظة وجود هالة سوداء تحيط بالمستعمرات بعد التحضين.

(وهذا الاختبار يعتبر مكافئ اختبار تخمر السالسين Salicin fermentation test الذي يُعد ظهور اللون الأصفر بعد التحضين دلالة على أن الاختبار موجب، في حين أن اللون الأحمر بعد التحضين يدل على أن الاختبار سالب). (وتعطي بكتيريا *Yersinia* نتيجة سالبة في هذين الاختبارين).

ب. اختبار البيرازيناميداز Pyrazinamidase test:

تُلقح أنابيب أجار مائل من بيئة أجار البيرازيناميداز Pyrazinamidase agar بتخطيط مساحة كبيرة من سطح الآجار المائل، وتحضن الأنابيب على درجة 30°م لمدة 48 ساعة، بعدها يضاف 1 مليلتر من محلول كبريتات الحديدوز النشادرية بتركيز 1 %، ويدل ظهور لون وردي أسمر خلال 15 دقيقة على أن التفاعل موجب. (وتعطي بكتيريا *Yersinia* نتيجة سالبة في هذا الاختبار).

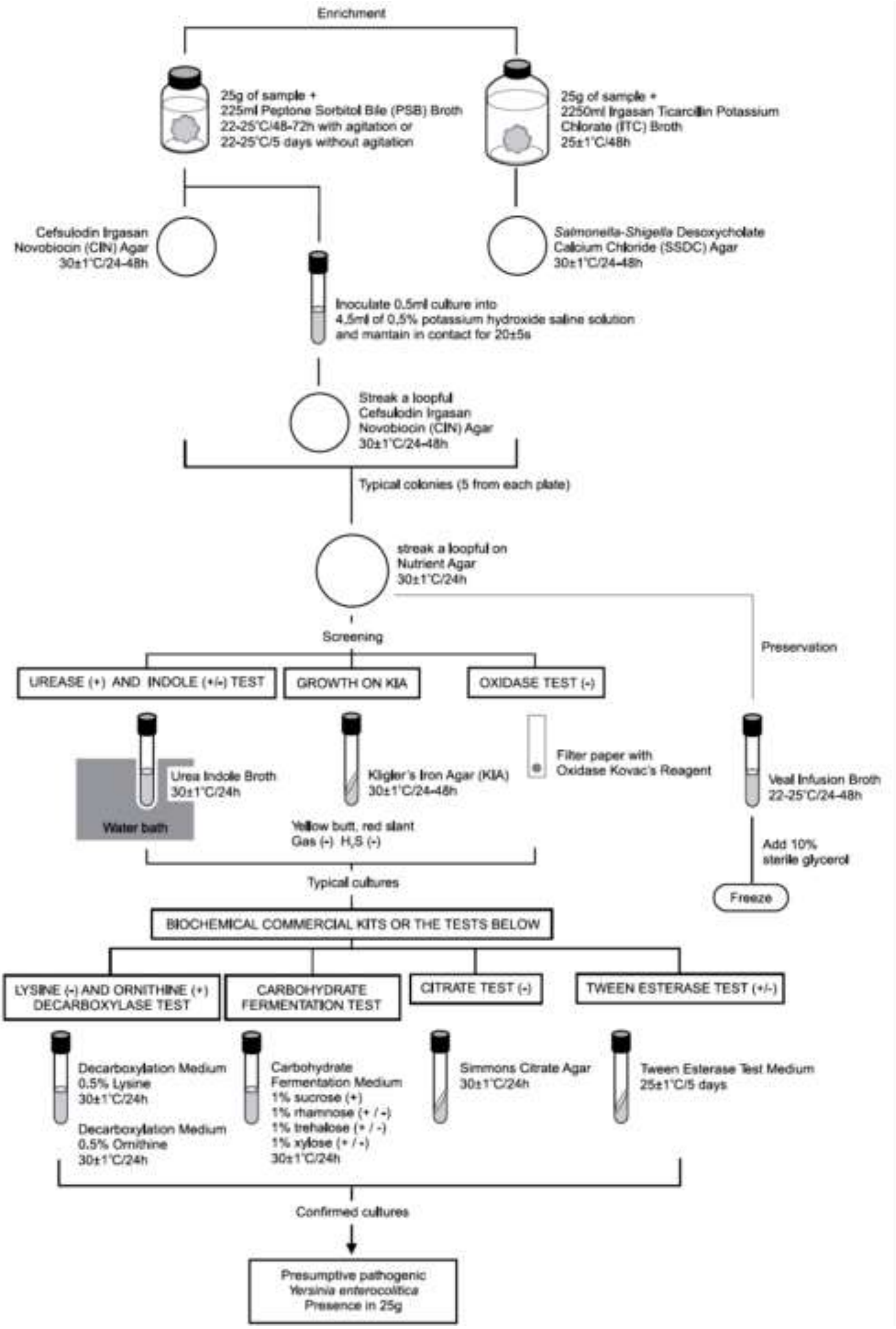
ج. اختبار الاحتياج للكالسيوم عند درجة حرارة 37°م:

يلقح محلول ملحي (0,5 % كلوريد كالسيوم) معقم بجزء من المستعمرات المنقاة على بيئة الآجار المغذي للحصول على معلق يحتوي على حوالي 10^3 وحدة مكونة للمستعمرة/مليلتر، ينقل من كل أنبوبة ملقحة على كل من:

- طبقان من بيئة أجار التِربْتِيكاز والصويا Trypticase Soy Agar (TSA)، (الطبق المرجعي).
- طبقان من بيئة أجار التِربْتِيكاز والصويا (TSA) المضاف إليها الماغنسيوم والأُوكْسالات.

يحضن أحد الطبقين من كل بيئة على درجة حرارة 25°م والأخر على درجة حرارة 37°م، يعتبر الاختبار موجب في حالة تكون مستعمرات متجانسة الحجم عند درجة حرارة 25°م (في كلا البيئتين) وحدوث تثبيط جزئي للنمو عند درجة حرارة 37°م في حالة بيئة (TSA) المضاف إليها الماغنسيوم والأُوكْسالات ينتج عنه ما يزيد نسبته عن 20 % من مستعمرات صغيرة قطرها حوالي 0,1 مليمتر مع وجود مستعمرات كبيرة أقطارها بين 0,5 - 1,0 مليمتر.

وتعتبر المستعمرات ممرضة في حالة تثبيط نموها (جزئياً) على درجة حرارة 37°م في حالة عدم وجود الكالسيوم (نتيجة أضافة الماغنسيوم والأُوكْسالات للبيئة) وهذا دليل على احتياجها للكالسيوم للنمو.



الشكل رقم (146) الكشف عن بكتيريا *Yersinia enterocolitica* في الأغذية، عن (Silva *et al.*, 2013).

ويلخص الجدول التالي النتائج الكيميوحيوية والباثولوجية لبكتيريا ***Yersinia enterocolitica*** الممرضة:

جدول رقم (16) النتائج الكيميوحيوية والباثولوجية لبكتيريا *Y. enterocolitica* الممرضة

الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة
إنزيم اليوريز **Urease**	+	تخمر السكروز	+
إنتاج الإندول **Indole**	+ أو -*	تخمر الرامنوز	+ أو -**
تخمر الجلوكوز (بيئة كليجلر **KIA**)	+	تخمر الترهالُوز	+ أو -**
إنتاج غاز من الجلوكوز (بيئة **KIA**)	-	تخمر الزّايلُوز	+ أو -**
تخمر اللأكتوز (بيئة كليجلر **KIA**)	-	استهلاك السترات	-
انتاج H_2S (بيئة كليجلر **KIA**)	-	اختبار التوين إسْتِريز	+ أو -**
إنزيم الأكسيديز **Oxidase**	-	تخمر الاسكولين وتخمر السالسين	-
نزع الكربوكسيل من اللايسين	-	اختبار البيرازيناميداز	-
نزع الكربوكسيل من الأورنيثين	+	الاحتياج للكالسيوم عند 37°م	+

* الضرب الحيوي **Biovar 1** وبعض الضروب المصلية **serovars** من الضرب الحيوي 2 تُعطي نتيجة موجبة لاختبار الإندول، في حين أن الضروب الحيوية 3 و 4 و 5 إضافة إلى بعض الضروب المصلية من الضرب الحيوي 2 تُعطي نتيجة سلبية لاختبار إنتاج الإندول.

** وذلك حسب الضروب الحيوية لبكتيريا *Y. enterocolitica*، كما يتضح من الجدول 17.

جدول رقم (17) خصائص الضروب الحيوية لبكتيريا *Y. enterocolitica*.

الخصائص	الضروب الحيوية **Biovar**					
	1 A*	**1 B**	**2**	**3**	**4**	**5**
اختبار التوين إسْتِريز	+	+	-	-	-	-
تخمر الاسكولين	+	-	-	-	-	-
اختبار البيرازيناميداز	+	-	-	-	-	-
إنتاج الإندول **Indole**	+	+	(+)**	-	-	-
تخمر الزّايلُوز	+	+	+	+	-	D**
تخمر الترهالُوز	+	+	+	+	+	-

D متباين. * غير ممرضة **Non-pathogenic**. ** غالباً ما تكون النتيجة ضعيفة وتظهر متأخرة.

<u>ملحوظة</u>: قبيل المرحلة الثالثة (مرحلة الاختبارات التأكيدية) التي تجرى على خمسة مستعمرات نموذجية من البكتيريا المعزولة في المرحلتين السابقتين، وعند تلقيح الخمس مستعمرات على سطح طبق الآجار المغذي وتحضينها على درجة حرارة 30°م لمدة 24 ساعة وقبل اجراء الاختبارات التأكيدية على تلك المستعمرات، يتم تلقيح أنابيب من حســــاء نقيع لحم العجل Veal Infusion Broth (بجزء من هذه المستعمرات المنقاة على الآجار المغذي) وتحضن الأنابيب على درجات حرارة بين 22 - 25°م لمدة 48 ساعة، بعدها يضاف للأنابيب 10 % من الجليسيرول المُعقم وتحفظ تحت التجميد (ويفضل عند درجة حرارة 70°م تحت الصفر).

عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio cholerae* في الأغذية ومياه الشرب:

تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio cholerae* في الأغذية ومياه الشرب في التالي:

1- في حالة فحص عينات الأغذية البحرية أو الخضروات فيتم وزن 25 جرام من عينة الغذاء وتجنس مع 225 مليلتر من وسط التنشيط الإنْتِقائِيّ ماء الببتون القلوي Alkaline Peptone Water (APW).

2 - أما في حالة فحص عينات مياه الشرب يتم جمع لتر واحد من كل عينة من عينات الماء المراد فحصها في قناني زجاجية معقمة محكمة الغلق وحاوية على 0,1 - 0,2 مليلتر من 10 % Sodium Thiosulfate ($Na_2S_2O_3$) وذلك لمعادلة الكلور الموجود في مياه الشرب والحد من تأثيره على الأحياء المجهرية أثناء تجميع ونقل العينات. وترج العينات جيداً لضمان توزيع الاحياء المجهرية بصورة متجانسة. بعد ذلك يتم إضافة 100 مليلتر من عينة الماء الى حجم مماثل من وسط التنشيط الإنْتِقائِيّ APW المُحضر بتركيز مضاعف.

3 - تحضن العينات على درجة حرارة 35°م لمدة 6 - 8 ساعات (ويجب ان لا تزيد مدة التحضين على هذه المدة لان الوسط سوف يصبح حامضياً مما يؤدي الى نمو أنواع أخرى من البكتيريا المعوية). وبالنسبة للأغذية المصنعة (المعاملة حرارياً أو المجمدة أو المجففة) يتم إعادة التنشيط في وسط التنشيط الإنْتِقائِيّ APW و تحضن هذه العينات على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي.

4 - يتم نقل جزء من النمو من وسط التنشيط الإنْتِقائِيّ APW إلى أطباق مصبوبة حاوية على الوسط التفريقي Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar، وتحضن الأطباق على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة. بعدها تُفحص الأطباق للبحث عن مستعمرات بكتيريا *V. cholerae* النموذجية التي تتميز بكونها مستعمرات كبيرة (قطرها 2 - 3 مليمتر) مخاطية محاطة بهالة شفافة، تكون صفراء اللون (نتيجة لتخمر سكر السكروز وتحول الوسط الى الحامضية مما ادى الى تغيير لون الوسط من الازرق الغامق الى الاصفر، لكن إذا استمر تحضين الأطباق لأكثر من 48 ساعة فتصبح المستعمرات إلى خضراء اللون نتيجة لاستهلاك السكروز وتحول الوسط الى القلوي نتيجة لتراكم الفضلات الأيضية).

5 - لإجراء الاختبارات للتأكد من أن المستعمرات تعود لبكتيريا *V. cholerae* تخطط المستعمرات النموذجية على أنابيب أجار مائل من وسط Tryptone Salt Agar (T_1N_1 Agar)، وفي حالة ما إذا كانت أطباق (TCBS) مزدحمة فيتم تنقية المستعمرات بالتخطيط على أطباق (T_1N_1) ثم نقلها أنابيب أجار مائل من (T_1N_1) وذلك قبل إجراء الاختبارات الكيميوحيوية التأكيدية. وتحضن أطباق وأنابيب (T_1N_1 Agar) على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي، بعدها تُجرى الاختبارات التأكيدية التالية:

أ. النمو على وسط الأرجنين والجلوكوز المائل **Growth on Arginine Glucose Slant:**

تلقّح أنابيب الآجار المائل AGS بالتخطيط على السطح المائل للبيئة على شكل متعرّج ثم وخز عُمق الآجار بإبرة التلقيح، ثم تحضن الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي (على أن لا يُحكم إغلاق أغطية هذه الأنابيب). تُعطى مستعمرات بكتيريا *Vibrio cholerae* النموذجية لون ارجواني "قاعدي" على السطح المائل لأنابيب AGS، في حين يكون في عُمق الآجار أصفر "حامضي" (دلالة على عدم تحلل الأرجنين) بدون أنتاج غاز أو H_2S.

[وتشترك في هذه النتيجة بكتيريا *V. Mimicus* لكن ما يميزها عن بكتيريا *V. cholerae* بوضوح أن مستعمراتها على وسط TCBS تكون خضراء اللون خلال 24 ساعة].

ب. الاحتياج للملح من أجل النمو **Salt requirement test:**

من أنابيب $(T_1N_1$ Agar) Tryptone Salt Agar (الذي يتكون من 10 جرام تريبتون، + 10 جرام NaCl، + 20 جرام آجار + 1000 مليلتر ماء مقطر) تُلقح أنابيب حساء T_1N_0 Broth (أي T_1N_1 Broth بدون NaCl) وأنابيب حساء T_1N_3 Broth (أي T_1N_1 Broth لكن كمية فيه NaCl 30 جرام/لتر وليست 10 جرام/لتر) ثم تحضن الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي. بكتيريا *V. cholerae* لا تحتاج إلى الملح للنمو وتنمو بشكل جيد في أنابيب T_1N_0 Broth، وكذلك في أنابيب T_1N_3.

ج. اختبار الخيط **String test**: وفي هذا الاختبار يُنقل مِلْءُ الحلقة السلكية الناقلة ويتم استحلابها مع قطرة من 0,5 % ديوكْسِيكُولاَت الصوديوم Sodium Desoxycholate. خلال 60 ثانية يحدث تحلل للخلايا البكتيرية (ويظهر ذلك على هيئة فقدان للعكارة)، وهنا يمكن رفع DNA المتحرر من الخلايا بواسطة الحلقة السلكية الناقلة على هيئة خيط (يتراوح طوله بين 2 - 3 سنتيمتر). بكتيريا *Vibrio cholerae* إيجابية لهذا الاختبار.

د. اختبار إنزيم الأكسيديز **Oxidase:**

في هذا الاختبار يجب عدم استخدام الحلقة السلكية الناقلة المصنوعة من النيكل/كروم بل يتم استخدام حلقة سلكية ناقلة مصنوعة من البلاتين/إيريديوم أو قضيب زجاجي، حيث يؤخذ جزء من المستعمرة من أنابيب T_1N_1 Agar وتوضع على ورقة نشاف مبللة بكاشف الاكسيديز، وتعتبر النتيجة سلبية إذا لم يتغير اللون إلى البنفسجي أو الأزرق في خلال 10 ثواني. وتكون بكتيريا *Vibrio cholerae* و *V. Mimicus* إيجابية لهذا الاختبار.

هـ. اختبارات التلبد (التَلَازُن) المصلية **Serologic agglutination tests:**

تَّنْميطُ ***Vibrio cholerae*** المَصْلِيّ يتم باستخدام مولدات الضد التي تُعطينا دلالات مهمة عن قدرة السلالة المختبرة على إحداث المرض. حيث أن بكتيريا ***V. Cholerae*** التي تُحدث مرض الكوليرا تتبع النمط المصلي **O1** أما التي لا تتبع هذا النمط المصلي **(Non-O1)** فتكون مسؤولة عن احداث أعراض مرض شبيه بالكوليرا الا أنه أقل إمراضية وخطورة منه، لكنها أكثر مقاومة للعوامل الكيميائية لامتلاكها لمولدات الضد المحفظية **(K-Ag)**. وفي عام **1993**م حدث تفشي لوباء الكوليرا وكان البكتيريا المسؤولة عنه لا تتبع النمط المصلي **O1** **(Non-O1)** وقد عرف لاحقاً أنها تتبع النمط المصلي **O139**.

ويتم اجراء الاختبار باستخدام اختبار التلبد الشريحي **Slide Agglutination test**، (مع الحرص على استبعاد السلالات التي تحدث تجمع ذاتي)، فتُقسم الشريحة الزجاجية إلى ثلاثة أقسام (بحدود **1 × 2** سنتيمتر) وتُعلم الأقسام، ويضاف لكل قسم قطرة من محلول ملحي فسيولوجي **0,85 %**، وتنشر هذه القطرة مع جزء من المستعمرة المراد اختبارها للحصول على معلق متجانس ثم ترج الشريحة بحرص لمدة **30 – 60** ثانية وتلاحظ النتيجة، وفي حال وجود تجميع بكتيري مميز كثير أو قليل تعتبر هذه السلالة من التي تحدث تجمع ذاتي ويتعذر متابعة الاختبارات المصلية.

وفي حالة عدم وجود تجمع ذاتي للمستعمرات تُضاف قطرة من مصل ***V. cholerae*** المضاد متعدد التكافؤ التابع للنمط المصلي **O1 (Polyvalent *V. cholerae* O1 antiserum)** للقسم الثاني وقطرة من المصل المضاد **O139 (Polyvalent O139 antiserum)** للقسم الثالث، ثم ترج الشريحة بحرص لمدة **30 – 60** ثانية وتلاحظ النتيجة لمعرفة النمط المصلي هل هو ***V. cholerae* O1** أم ***V. cholerae* O139**.

وفي نفس الوقت يقسم النمط المصلي **O1** بالاعتماد على المستضد **(O-Ag)** الى ثلاث انماط تحت مصلية **Sub Serotype** هي: **Ogawa**، و **Inaba**، و **Hikojima**. وهذا المستضد مكون من ثلاث أجزاء هي **A,B,C** حيث يمتلك **Ogawa (A,B)** ويمتلك **Inaba (A,C)** ويمتلك **Hikojima (A,B,C)**، وهنا تُكرر هذه العملية باستخدام الامصال المضادة احادية التكافؤ **Monovalent** لكل من النمطين **Ogawa** و **Inaba**، حيث توضع قطرة من المصل الاحادي لكل من النمطين **Ogawa** و **Inaba** كل على حدة ويمزج معها جزء من المستعمرة البكتيرية وتفحص تحت المجهر. حدوث التلبد (التَلَازُن) في احدى القطرات دليل على تحديد النمط المصلي. أما إذا حدث في القطرتين معاً فهو دلالة على أن النمط المصلي هو **Hikojima**.

وقد عرفنا سابقاً أن بكتيريا *Vibrio cholerae* تنقسم إلى نمطين حيويين الأول يُعرف بالنمط الحيوي التقليدي *V. cholerae* biotype *cholerae* والثاني يُعرف بنمط الطُور *V. cholerae* biotype *eltor*، والذي عُزل لأول مرة عام 1905م في مخيم للحجاج إلى مكة المكرمة في شبه جزيرة سيناء وسميت نسبة الى اسم منطقة الطُور التي عزلت فيها في سيناء ومنذ ذلك الحين ازدادت أهميتها لكونها اصبحت المسؤولة عن احداث الأوبئة الأخيرة في جنوب شرق اسيا وفي افريقيا وهي اكثر انتشارا من النمط التقليدي الذي بدأ بالانحسار، وبالرغم من وجود بعض الاختلافات بين النمطين حيث أن نمط الطُور أكثر مقاومة للظروف الخارجية ونسبة الوفاة فيه أقل، إلا أنهما متشابهتان من حيث الأعراض المرضية العامة. كما ان كلا من النمطين الحيويين التقليدي والطُور يحويان على الأنماط تحت مصلية الثلاث السابقة الذكر (Ogawa، و Inaba، و Hikojima). ويمكن التفريق بين هذان النمطان الحيويان (بالنمط الحيوي التقليدي ونمط الطُور) من خلال:

1 - تحلل كريات الدم الحمراء من نوع β (β-hemolysis):

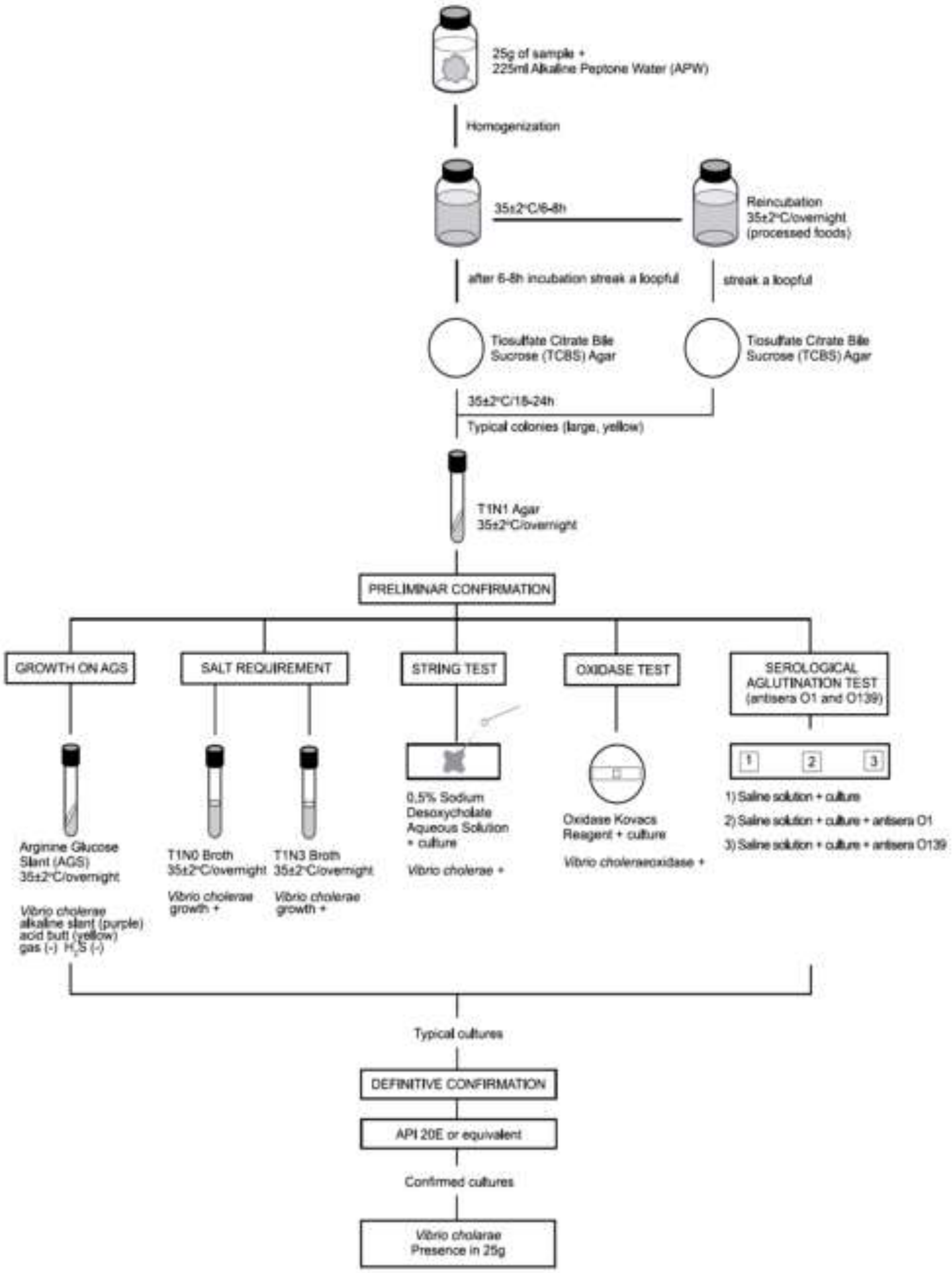
من أنابيب T_1N_1 Agar تُلقح أطباق حاوية على وسط آجار دم الخروف Sheep Blood Agar وتُحضن على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة، ويختبر تحلل الدم الناتج على الأطباق حيث أن *V. cholerae* biotype *eltor* يستطيع تحليل كريات الدم الحمراء تحليلاً كاملاً β-hemolysis، في حين أن *V. cholerae* biotype *cholerae* (النمط الحيوي التقليدي) لا يحلل كريات الدم الحمراء.

2 - الحساسية للمضاد الحيوي بولي ميكسين B (Polymyxin-B sensitivity):

من أنابيب T_1N_1 Agar المائلة تُلقح أطباق حاوية على وسط T_1N_1 Agar ويوضع قرص حاوي على 50 وحدة من المضاد الحيوي Polymyxin-B على سطح كل طبق، وتُحضن على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي وتلاحظ النتائج. يكون النمط الحيوي التقليدي *V. cholerae* biotype *cholerae* حساس للمضاد الحيوي Polymyxin-B وتظهر حول القرص منطقة تثبيط تبلغ أكبر من 12 مليمتر، في حين أن نمط الطـــــور *V. cholerae* biotype *eltor* يكون مقاوم للمضاد الحيوي Polymyxin-B.

و. الاختبارات التأكيدية الكيميوحيوية:

يتم استخدام نظام Api20E وذلك لتأكيد تشخيص البكتيريا المعزولة وهذا ما سبق توضيحه في فصل سابق.



الشكل رقم (147) الكشف عن بكتيريا *Vibrio cholerae* في الأغذية، عن (Silva *et al.*, 2013).

عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio parahaemolyticus* في الأغذية:

تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا *Vibrio parahaemolyticus* في الأغذية في التالي:

1- يوزن 50 جرام من عينة الغذاء (بحيث تتضمن العينة في الأسماك كل من الأنسجة السطحية والخياشيم والأحشاء، أما في القِشْرِيّات كالجمبري يؤخذ الحيوان بالكامل إن أمكن ذلك أو الجزء المركزي بضمنه والخياشيم والأحشاء)، وتجنس مع 450 مليلتر من وسط الفوسفات الملحي المنظم Phosphate Buffered Saline (PBS)، لتحضير المعلق الابتدائي 10^{-1}.

أما في عينات المَحار فتُؤخذ عدد 12 مَحارة مع كمية من PBS (بنسبة 2:1) وتُجنس بالخلاط الدوار لمدة 90 ثانية ويُحضر منها المعلق الابتدائي 10^{-1} بأخذ 20 مليلتر من العينة المُجنسة (المحضرة بنسبة 2:1) وتُضاف إلى 80 مليلتر من وسط الفوسفات الملحي المنظم PBS.

2 - تجهز التخفيفات العشرية من المعلق الابتدائي بإضافة تسعة أضعاف الحجم من محلول التخفيف وتكرار هذه العملية عند كل تخفيف حتى يتم تحضير سلسلة من التخفيفات العشرية مناسبة، وينقل 1 مليلتر من كل تخفيف من التخفيفات العشرية (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}) إلى ثلاثة أنابيب حاوية على 10 مليلتر من وسط Alkaline Peptone Water (APW).

[وإذا كنا نتوقع أن تكون أعداد بكتيريا *V. parahaemolyticus* قليلة في عينات الأغذية المصنعة (المعاملة حرارياً أو المجمدة أو المجففة) يتم بدء سلسلة الثلاثة أنابيب المتسلسلة بنقل 10 مليلتر من المعلق الابتدائي (10^{-1}) إلى ثلاثة أنابيب حاوية على 10 مليلتر من وسط APW (المحضر بتركيز مضاعف)، ثم يتم نقل 1 مليلتر من كل تخفيف من التخفيفات العشرية (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}) إلى ثلاثة أنابيب حاوية على 10 مليلتر من وسط APW كما سبق]، وتحضن هذه الأنابيب على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة.

3 - ينقل لقاح بواسطة إبرة زرع من الطبقة السطحية للأنابيب الموجبة إلى أطباق تحتوى على بيئة Thiosulfate Citrate Bile Sucrose (TCBS) Agar، وتحضن الأطباق على درجة حرارة 35°م لمدة 18 - 24 ساعة. بعدها تُفحص الأطباق للبحث عن مستعمرات بكتيريا *V. parahaemolyticus* النموذجية التي تتميز بكونها مستعمرات دائرية معتمة، خضراء اللون أو مُزْرَقّة (كونها غير مُخمرة سكر السكروز). [كذلك فإن مستعمرات *V. Vulnificus* تكون شبيهة بها].

4 - تخطط المستعمرات النموذجية على أنابيب أجار مائل من وسط Tryptone Salt Agar (T_1N_1 Agar)، وفي حالة ما إذا كانت أطباق (TCBS) مزدحمة فيتم تنقية المستعمرات بالتخطيط على أطباق (T_1N_1) ثم نقلها أنابيب أجار مائل من (T_1N_1) وذلك قبل إجراء الاختبارات الكيميوحيوية التأكيدية. وتحضن أطباق وأنابيب (T_1N_1 Agar) على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي، بعدها تُجرى الاختبارات التأكيدية التالية:

أ. النمو على وسط الأرجنين والجلوكوز المائل AGS الحاوي على 2 - 3 % NaCl:

تلقّح أنابيب الآجار المائل AGS (الحاوي على 2 - 3 % NaCl) بالتخطيط على السطح المائل للبيئة على شكل متعرّج ثم وخز عُمق الآجار بإبرة التلقيح، ثم تحضن الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي (على أن لا يُحكم إغلاق أغطية هذه الأنابيب). مستعمرات *V. parahaemolyticus* النموذجية تُعطى أيضاً لون ارجواني "قاعدي" على السطح المائل لأنابيب AGS، في حين يكون في عُمق الآجار أصفر "حامضي" (دلالة على عدم تحلل الأرجنين) بدون أنتاج غاز أو H_2S.

ب. الاحتياج للملح من أجل النمو Salt requirement test:

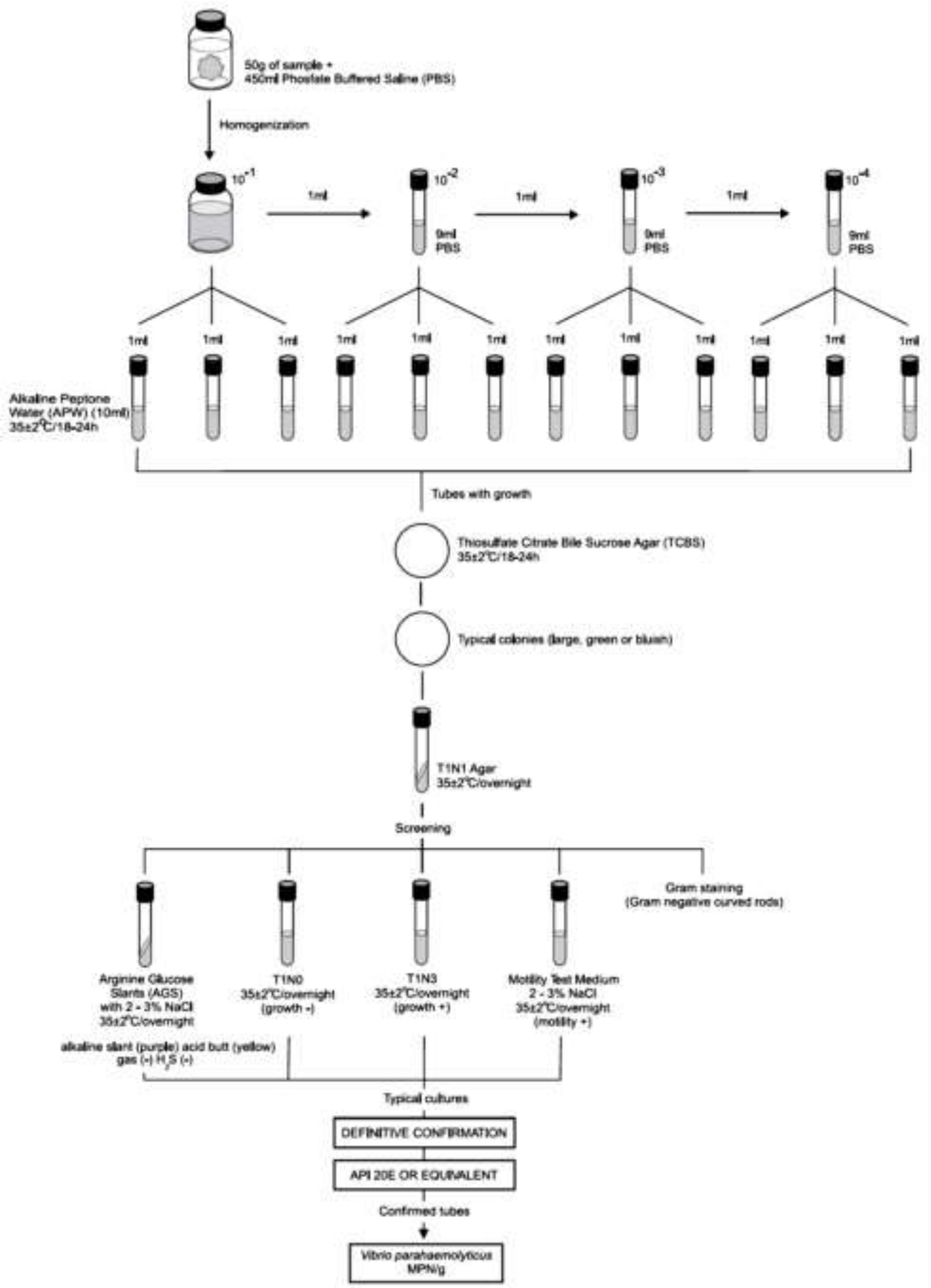
من أنابيب Tryptone Salt Agar (T_1N_1 Agar) تُلقح أنابيب حساء T_1N_0 Broth وأنابيب حساء T_1N_3 Broth ثم تحضن الأنابيب الملقحة على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي. بكتيريا *V. parahaemolyticus* تحتاج إلى الملح للنمو لذا فإنها تنمو بشكل جيد في أنابيب T_1N_3 Broth لكنها لا تنمو في أنابيب T_1N_0 Broth.

ج. تصبيغ جرام واختبار الحركة Gram stain and motility test: من أنابيب T_1N_1 المائلة يتم تصبيغ البكتيريا بصبغة جرام، كما يتم إجراء اختبار الحركة في أنابيب حاوية على وسط Motility Test Medium الحاوي على 2 - 3 % NaCl عن طريق وخز الآجار وتحضن على درجة حرارة 35°م حتى صباح اليوم التالي. *V. parahaemolyticus* هي بكتيريا متحركة سالبة لتصبيغ جرام.

د. الاختبارات التأكيدية الكيميوحيوية:

البكتيريا المتحركة والسالبة لتصبيغ جرام التي تُعطى لون ارجواني (قاعدي) على السطح المائل لأنابيب AGS، وعُمق الآجار أصفر (حامضي) بدون أنتاج غاز أو H_2S وتنمو بشكل جيد في أنابيب T_1N_3 لكنها لا تنمو في أنابيب T_1N_0 Broth يتم استخدام نظام Api20E لتأكيد أنها بكتيريا *V. parahaemolyticus* أم لا.

5 - يسجل لكل تخفيف من تخفيفات العينة عدد الأنابيب التي أعطت نتيجة إيجابية للاختبارات التأكيدية، وعند استخدام ثلاثة تخفيفات متتالية فقط للعينة يتم تحديد قيمة العدد الأكثر احتمالاً MPN المقابلة لها مباشرة في جداول العدد الأكثر احتمالاً MPN (كما عرفنا سابقاً).



الشكل رقم (148) الكشف عن *Vibrio parahaemolyticus* في الأغذية، عن (Silva *et al.*, 2013).

عزل وتشخيص بكتيريا *Campylobacter jejuni* في الأغذية:

تلخص خطوات عزل وتشخيص بكتيريا *Campylobacter jejuni* في الأغذية في التالي:

1- يوزن 25 جرام من عينة الغذاء وتجنس مع 225 مليلتر من وسط حساء بولتون Bolton، وتُحضن على درجة حرارة 37°م لمدة 4 - 6 ساعات، ثم على درجة حرارة 41,5°م لمدة 44 ساعة في جو قليل الهواء (5 % O_2، 10 % CO_2، 85 % N_2) في وعاء التحضين اللاهوائي Anaerobe jar في وجود أغلفة توليد الغاز Gas-generating envelopes المناسبة المتوفرة تجارياً.

2 - بعد ذلك يُنقل كمية من النمو من حساء بولتون Bolton إلى أطباق حاوية على بيئة Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar (mCCDA) وتُحضن على درجة حرارة 41,5°م لمدة 44 ساعة في جو قليل الهواء (كما سبق).

3 - بعد فترة مُضي التحضين، تُفحص الأطباق للبحث عن مستعمرات *Campylobacter spp.* النموذجية التي تتميز في الغالب بكونها مستعمرات على هذا الوسط تكون مائلة للانْتِشار ذات لون ضارب الى الرمادي غالباً مع بريق معدني.

4 - لإجراء الاختبارات التأكيدية تُؤخذ على الأقل مستعمرة واحدة من كل طبق (وفي حالة ما إذا أعطت الاختبارات التأكيدية نتائج سلبية، يتم أخذ أربع مستعمرات إضافية لإجراء هذه الاختبارات). تُخطط هذه المستمرات على أطباق حاوية على وسط آجار الدم كولومبيا (CBA) Columbia Blood Agar وتُحضن الأطباق في جو قليل الهواء على درجة حرارة 41,5°م لمدة 24 - 48 ساعة. ويتم إجراء الاختبارات التأكيدية التالية:

الصفات المُورْفُولُوجْية والقدرة على الحركة Morphology and motility:

يُؤخذ جزء من النمو من المستعمرات في أطباق وسط آجار الدم كولومبيا CBA ويُعلق مع 1 مليلتر من حساء البروسيلا *Brucella* Broth لدراسة الصفات المُورْفُولُوجْية تحت المجهر، فتظهر بكتيريا *Campylobacter spp.* بشكل عصيات منحنية تتحرك بشكل لَوْلَبِيّ (شبيهة بنازعة السِّدادات الفِلّينية Corkscrew). المستعمرات التي تكون بهذه الصفات المُورْفُولُوجْية يتم اكمال بقية الاختبارات التأكيدية التالية :

أ. النمو على درجة حرارة 25°م في جو قليل الهواء Growth at 25°C (Microaerobic):

من المستعمرات النامية في أطباق وسط آجار الدم كولومبيا CBA، يتم تلقيح أطباق CBA جديدة وتُحضن الأطباق في جو قليل الهواء على درجة حرارة 25°م لمدة 44 ساعة ويتم اختبار النمو على الأطباق. تُظهر بكتيريا *Campylobacter spp.* نتيجة سلبية لهذا الاختبار.

ب. النمو على درجة حرارة 41,5°م (aerobic) Growth at 41,5°C:

من المستعمرات النامية في أطباق وسط آجار الدم كولومبيا CBA، يتم تلقيح أطباق CBA جديدة وتُحضن الأطباق (هوائياً) على درجة حرارة 41,5°م لمدة 44 ساعة ويتم اختبار النمو على الأطباق. وتُظهر بكتيريا *Campylobacter spp.* نتيجة سلبية لهذا الاختبار.

ج. اختبار إنزيم الأكسيديز Oxidase:

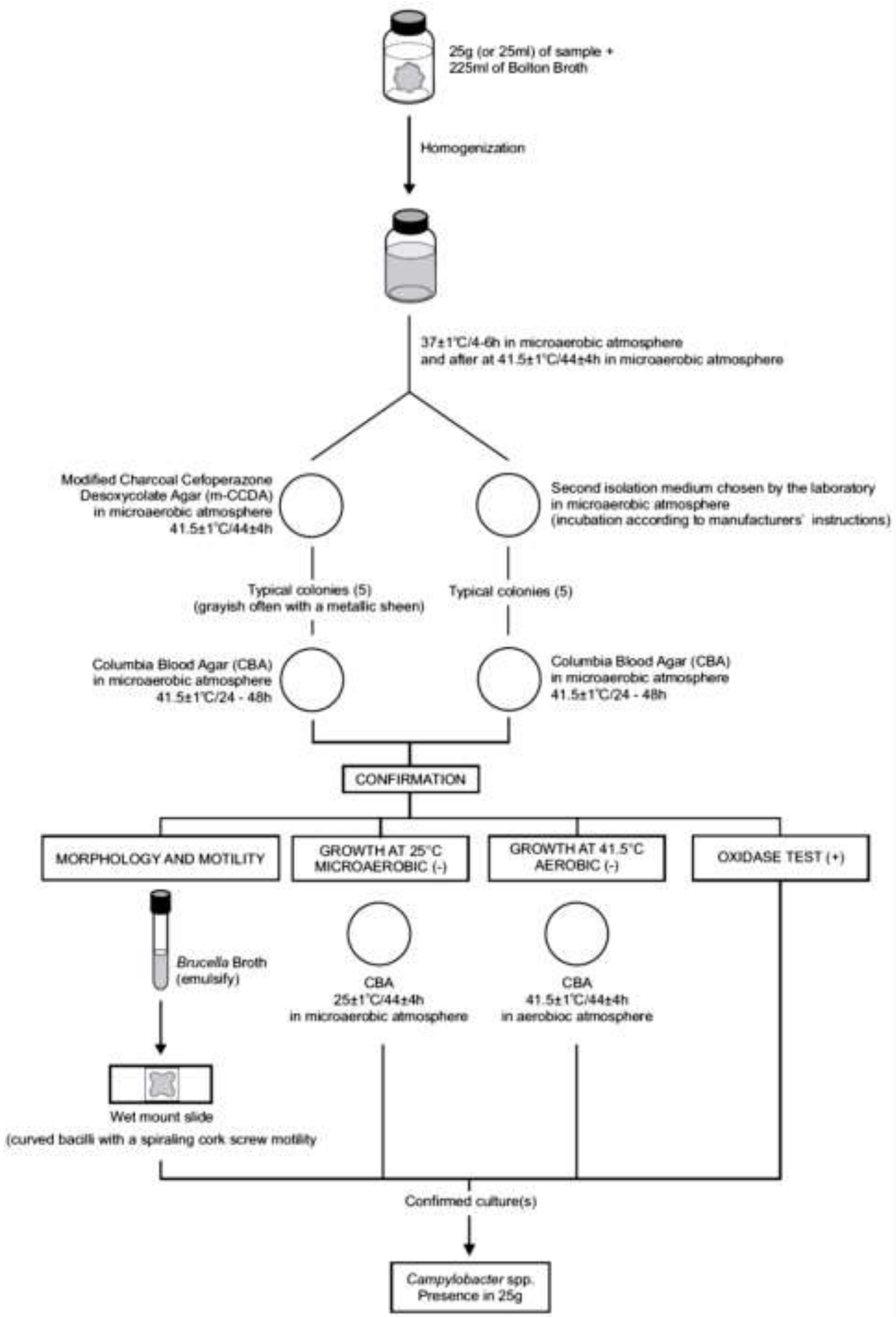
باستخدام حلقة سلكية ناقلة مصنوعة من البلاتين/إيريديوم أو قضيب زجاجي، يؤخذ جزء من المستعمرات النامية في أطباق وسط آجار الدم كولومبيا CBA وتوضع على ورقة نشاف مبللة بكاشف الاكسيديز، وتعتبر النتيجة سلبية إذا لم يتغير اللون إلى البنفسجي أو الأزرق في خلال 10 ثواني. وتكون بكتيريا *Campylobacter spp.* إيجابية لهذا الاختبار.

بعد أجراء الاختبارات التأكيدية السابقة يظهر جلياً لنا أن العزلة قيد الاختبار تعود لبكتيريا الكميلوبكتر المحبة لدرجات الحرارة العالية Thermophilic *Campylobacter* أو لا، وفي حال ما إذا كانت العزلة المدروسة بكتيريا عصوية منحنية تتحرك بشكل لَوْلَبِيّ (شبيهة بنازعة السِّدادات الفِلّينية Corkscrew) تنمو بشكل جيد في جو قليل الهواء على درجة حرارة 41,5°م لكنها لا تتمكن من النمو على درجة حرارة 25°م في جو قليل الهواء ولا النمو على درجة حرارة 41,5°م عند تحضينها هوائياً.

بين أكثر أنواع بكتيريا Thermophilic *Campylobacter* النامية على درجة حرارة 41,5°م في جو قليل الهواء كل من *Campylobacter jejuni* و *Campylobacter coli* كذلك هناك أنواع أخرى مثل *Campylobacter lari* و *Campylobacter upsaliensis* ...الخ.، ويمكن تمييز هذه الأنواع عن بعضها من خلال عدد من الاختبارات مثل اختبار الكتاليز Catalase والحساسية للمضادات الحيوية Cephalothin و Nalidixic acid وكذلك اختبار التحلل المائي Hydrolysis لكل من الهيبورات Hippurate وخَلاَّت الإندوكسيل Indoxyl acetate، إلا أن اختبار التحلل المائي للهيبورات هو أهم اختبار يُميز *Campylobacter jejuni* حيث يعطي نتيجة موجبة في حين أن بقية الأنواع المذكورة الأخرى تعطي نتيجة سلبية لهذا الأختبار.

ويتلخص هذا الاختبار في أخذ جزء من النمو من المستعمرات في أطباق وسط آجار الدم كولومبيا CBA ويُعلق في 0,4 مليلتر من محلول هيبورات الصوديوم Sodium Hippurate ويُحضن على درجة حرارة 37°م لمدة ساعتين في حمام مائي أو لمدة 4 ساعات في الحاضنة، بعدها يُضاف 0,2 مليلتر من محلول النينْهيدْرين Ninhydrin ويُحضن على 37°م لمدة 10 دقائق (سواء في الحمام المائي أو في الحاضنة) بدون رج.

النتيجة الموجبة تكون من خلال ظهور لون بنفسجي غامق، في حين أن ظهور لون بنفسجي شاحب أو عدم تغير اللون يعتبر نتيجة سلبية.



الشكل رقم (149) الكشف عن ***Campylobacter jejuni*** **في الأغذية، عن (Silva *et al.*, 2013).**

الفصل الخامس

ميكروبيولوجيا اللحوم والدواجن Meat & Poultry Microbiology

تٌعرف اللحوم على أنها الأنسجة الحيوانية المناسبة للاستهلاك كغذاء للإنسان. وفي الغالب يشمل هذا التعريف النسيج العضلي الحيواني والدهن المتعلق به، لكن في بعض الأحيان يقصد به الأعضاء غير العضلية مثل الكبد، المخ، الرئة، الكلى، ونخاع العظم. وتشمل اللحوم الحمراء (لحوم الأبقار والأغنام والماعز والجمال) واللحوم البيضاء (الدجاج، البط الاوز، الديك الرومي، الأرانب، النعام، والسمان)، وهذا التقسيم حسب تركيز الميوجلوبين في الأنسجة العضلية، فاللحوم الحمراء يكون نسبة الميوجلوبين فيها أعلى من اللحوم البيضاء. والتركيب الكيميائي للّحوم يختلف حسب عمر ونوع الحيوان وفي الغالب يكون: 64 % - 80 % رطوبة، 16 % - 20 % بروتين، 6 % - 10 % دهون، 1 % رماد وهو ما يتضح من الجدول التالي:

جدول رقم (18): التركيب الكيميائي لِلّحوم بعض الحيوانات (كمية في 100 جرامِ جزء صالح للأكل)*

التحليل التقريبي	الثور	العجل	الخَرُوف	الماعِز	لحم دجاج فاتح**	لحم دجاج غامق**
الماء (الرطوبة)	70.62	73.42	75.91	75.84	73.70	73.70
الطاقة (ك سعر حراري)	144	134	112	109	111	125
البروتين (النيتروجين × 6,25)	20.78	20.29	20.20	20.60	23.40	20.60
الدهون الكلية	6.16	5.25	2.87	2.31	1.90	4.70
الكربوهيدرات	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
الرماد	1.02	1.06	1.08	1.11	1.00	1.00

* المصدر (Lund *et al.*, 2000)، **(الرجب والقزاز، 1982).

ويتضح مما سبق بأن اللحوم تكون خالية تقريباً من الكربوهيدرات، وهي مع ذلك بيئة ممتازة لنمو الأحياء المجهرية (فالأحياء المجهرية المتسببة في فساد وتلف اللحوم تكون ذات قدرة على تحليل بروتينات اللحوم وهي بالتالي تحصل على احتياجاتها من كلٍ من الكربون والنيتروجين من الأحماض الأمينية لبروتينات اللحوم)، كما أن اللحوم تعتبر مصدراً جيداً للعديد من الفيتامينات والعناصر المعدنية. وإضافة إلى احتواء اللحوم على العناصر المغذية التي تساعد الأحياء المجهرية على القيام بعملياتها الحيوية، فهي أيضاً تحتوى على نشاط مائي مناسب ومدى مناسب من جهد الأكسدة والاختزال وقيمة أس هيدروجيني ملائمة لعدد كبير جداً من الأحياء المجهرية، وعلى ذلك فاللحوم من المواد القابلة للتلف والفساد بواسطة الأحياء المجهرية بسهولة، لذلك يجب العناية التامة بهذا النوع من المواد الغذائية حرصاً على وصولها للمستهلك بكامل جودتها من الناحيتين الاقتصادية والصحية.

وفي الغالب لا تحتوي أنسجة اللحوم الداخلية للحيوان السليم الخالي من الأمراض على أي من الأحياء المجهرية، فجلد الحيوان وكذلك الأغشية المبطنة للأحشاء الداخلية تشكل أغلفة واقية ضد غزو الأحياء المجهرية للأنسجة الداخلية، إضافة إلى ما يوجد في سوائل جسم الحيوان وأنسجته وغدده من دفاعات مثل كرات الدم البيضاء والأجسام المضادة. لكن قد يحدث تلوث لهذه الأنسجة الداخلية في حالات تعرض الحيوان إلى عمليات الإجهاد الجسدي (العطش أو الجوع الشديدين، أو التبدلات الحرارية المفاجئة) التي تؤثر في الجهاز المناعي للحيوان وتؤدي إلى ضعف مقاومة الجسم وحدوث خلل في نفاذية بعض الأغشية مما يسمح بمرور الأحياء المجهرية إلى العضلات عن طريق الأوعية الدموية الموجودة في تلك المنطقة، وهذا ما يطلق عليه التلوث الأولى للّحوم **Meat Primary Contamination**. أما التلوث الثانوي للّحوم **Meat Secondary Contamination** فيحدث من التلوث خلال عملية ذبح الحيوان وعند سلخ الجلد عن اللّحم (نتيجة لتلامس اللّحم مع سكاكين الذبح والطاولات والعربات وأيدي ولباس العمال وأرضية المسلخ)، كما يحدث التلوث عند إزالة الأحشاء الداخلية ولا سيما عند تمزقها، إضافة إلى معاملات ما بعد الذبح (النقل، التداول، التصنيع، والتخزين....الخ).

ويبدأ الفساد في اللحوم بعد الذبح (الاستنزاف) مباشرة كنتيجة للعمليات الميكروبيولوجية والحيوية والكيميائية والفيزيائية التي تحدث فيها، فبعد الذبح توقف الأجهزة الدفاعية الحيوية في جسم الحيوان عن أداء دورها، وبالتالي فإن أنسجة الحيوان الداخلية تكون عرضة للتلوث، كما أن عدم النزف (الاستنزاف) الكامل لدم الذبيحة يؤدي إلى بقاء كمية من الدم فيها مما يشكل وسطاً ملائماً لنمو العديد من الأحياء المجهرية المؤدية لفساد اللّحم، كما يتغير النشاط الإنزيمي (الذي كان موجهاً لصالح الحيوان) إلى اتجاهات مخالفة عما سبق في حالة حياة الحيوان وذلك لتوقف التنفس ودوران الدم، فتدخل الذبيحة طور التصلب الرمي **Rigor mortis** وهي الظاهرة التي تحدث في اللحوم بعد الذبح بساعات نتيجة استنزاف جميع أشكال الطاقة الموجودة في العضلة في صورة **ATP** أو جلايكوجين، كما يحدث اتحاد للمركبات المكونة لألياف العضلة (الاكتين والميوسين) لتكوين مركب جديد يسمى اكتوميسين وهو اكثر صلابة كما أن قدرته على الذوبان في الماء ضعيفة مما يزيد صلابة العضلات، ونتيجة لهذه التغيرات تصبح العضلات اكثر صلابة وخشونة وقدرتها على الاحتفاظ بالماء ضعيفة وتنخفض قدرة بروتين العضلات على الذوبان وبعد الوصول الى قمة هذه المرحلة نجد ان درجة الحموضة تقل قليلا وكذلك ترتفع القدرة على الاحتفاظ بالماء والقابلية للذوبان وتزيد الليونة ولكن لا تعود الصفات ابدا الى حالتها الاولى، وتختلف مدة دخول العضلة في التيبس الرمي باختلاف نوع الحيوان فتكون في اللحوم الحمراء بحدود **6 – 12** ساعة بينما في لحوم الدواجن تكون بحدود **1 – 2** ساعة، ونتيجة لذلك تحدث تغيرات حيوية أو عضوية تؤدي إلى تغير في طبيعة أنسجة الحيوان وتركيبها ويقود إلي سرعة فسادها، وإذا لم توقف هذه العمليات فإن اللحوم تصبح غير ملائمة للاستهلاك البشري.

وفي عمليات الإنتاج الضخمة للّحوم يتم تجاوز هذه المشكلة (التصلب الرمي) من خلال عملية التعتيق Aging وهي العملية التي يتم فيها وضع الذبائح بكاملها في غرف التبريد خلال 24 ساعة من الذبح وتستمر هذه العملية حوالي 21 يوماً على درجة حرارة 2,2° - 3,3°م.

وتعتبر حالة الحيوانات قبل الذبح مهمة جداً في تحديد جودة اللحوم، ويعتبر الأس الهيدروجيني للّحوم واحد من أهم العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية فيها، حيث أنه بعد ذبح الحيوان يتحول الجلايكوجين الموجود في عضلاته إلى حامض اللاكتيك، مما يؤدي إلى انخفاض الأس الهيدروجيني من pH 7 (الأس الهيدروجيني في عضلات الحيوان الحي) إلى حدود pH 5.5، مما لا يسمح بنمو كثير من الأحياء المجهرية المسببة للفساد في هذه اللحوم التي حدث فيها تحول للجلايكوجين إلى حامض اللاكتيك الذي بدوره أحدث هذا الانخفاض في الأس الهيدروجيني. وهذه العملية تحدث بطبيعة الحال إذا كان الحيوان مرتاح قبل الذبح وتم تغذيته تغذية جيدة، أما في حالة الحيوانات المجهدة أو المثارة فإنها تستهلك الجلايكوجين المخزن في عضلاتها ولذلك يبقي الأس الهيدروجيني لنسيج هذه الحيوانات بعد الذبح مقارباً لـ pH 7، مما يسمح بالنمو السريع للأحياء المجهرية المسببة لتلف وفساد هذه اللحوم، ولذلك توصي المراجع العلمية المتخصصة بإراحة الحيوان قبل الذبح وعدم استثارته.

وقد وضح الدين الإسلامي هذه الحقيقة وشرّع إراحة الذبيحة قبل الذبح لما رواه الإمام مسلم في صحيحه أن رسول الله ﷺ قال {إن الله كتب الإحسان على كل شيء فإذا قتلتم فأحسنوا القتلة وإذا ذبحتم فأحسنوا الذبح وليحد أحدكم شفرته فليرح ذبيحته} وما ورد في السنن الكبرى للنسائي عن شداد بن أوس قال سمعت رسول الله ﷺ يقول {إن الله عز وجل كتب الإحسان على كل شيء فإذا قتلتم فأحسنوا القتلة وإذا ذبحتم فأحسنوا الذبح وليحد أحدكم إذا ذبح شفرته وليرح ذبيحته} وغيره مما صح عن رسول الله ﷺ.

<u>معاملة الحيوان قبل الذبح:</u>

لكي تهيئ الحيوانات للذبح يجب إراحتها بعد وصولها إلى المجزرة لتفادي أي تأثيرات سليبة قد تنجم نتيجة إجهادها أثناء النقل. ويكون ذلك في حظائر المسلخ التي تتوافر فيها كافة الشروط الصحية والخدمات اللازمة للحيوان ومن أهمها:

1- الراحة:

تؤثر فترة استراحة الحيوان في المسلخ قبل عملية الذبح في أعداد الأحياء المجهرية في اللحوم، فعند ذبح الحيوان مباشرة بعد وصوله إلي المسلخ يحتوى اللحم علي عدة أضعاف من الأحياء المجهرية للأحشاء الداخلية مقارنة مع الحيوانات التي تعطي فترة راحة مناسبة، وتتراوح الفترة التي يجب أن يقضيها الحيوان في الراحة قبل ذبحه ما بين 12 إلى 24 ساعة وذلك حسب ظروف النقل وحالة الحيوان العامة والظروف البيئية. ويجب تهيئة المناخ الملام لمعيشتها وعدم تعرضها للبرد أو التيارات الهوائية. مما يراعى عدم بقاء الحيوانات لفترة طويلة في الحظائر لتجنب مشاكل العدوى بين الحيوانات مثل عدوى السالمونيلا *Salmonella* في حظائر الأبقار.

2- مياه الشرب:

يجب أن يأخذ الحيوان كفايته من مياه الشرب النظيفة خلال فترة الانتظار والإعداد للذبح مما يسهل إجراء عملية سلخ الحيوان بالإضافة إلى تخفيف الأحياء المجهرية الموجودة بالأمعاء.

3- التغذية:

يجب تقدم عليقة متزنة للحيوان خلال فترة الراحة، ولكن من الضروري منع الطعام عن الحيوان قبل موعد الذبح لمدة 12 ساعة وذلك لتقليل فرصة تلوث اللحوم عند تفريغ الأحشاء ولا يفضل إطالة مدة تجويع الحيوان قبل الذبح، فقد وجد أن منع الأكل عن الحيوان اكثر من يوم قبل الذبح يسبب نقصاً ملحوظاً في وزن الذبيحة.

4- غسل وتنظيف الحيوان:

يجب غسل الحيوانات قبل ذبحها مباشرة وإزالة الأوساخ العالقة بسطح الجسم لمنع تلوث الذبيحة أثناء عملية السلخ. ولكن لا ينصح بغسل الحيوانات أثناء فصل الشتاء في البرد الشديد حتى لا يؤثر ذلك على نوعية اللحم الناتج.

ذبح الحيوان Slaughtering:

إن الخطوة الأولى في عملية الذبح هي اسْتِنْزاف الحيوان Exsanguination ويقصد بها التخلص من أكبر كمية ممكنة من الدم من جسم الحيوان، ويمكن إزالة 50 % من مجموع حجم الدم من جسم الحيوان. ويعتبر الدم وسط ممتاز لنمو الأحياء المجهرية المسببة لتلف اللحم وكذلك الأحياء المجهرية المرضية، لذلك فإن الدم الزائد المتبقي في أنسجة جسم الحيوان غير مرغوب فيه، لذلك يجب الحرص على الاستنزاف الجيد بعد عملية الذبح.

لذلك فالدين الإسلامي قد حرم الدم المسفوح على المسلمين قال تعالى ﴿إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالدَّمَ وَلَحْمَ الْخِنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ بِهِ لِغَيْرِ اللهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلاَ عَادٍ فَلا إِثْمَ عَلَيْهِ إِنَّ اللّهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [البقرة: 173]، وقال تعالى ﴿حُرِّمَتْ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةُ وَالْدَّمُ وَلَحْمُ الْخِنْزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللهِ بِهِ وَالْمُنْخَنِقَةُ وَالْمَوْقُوذَةُ وَالْمُتَرَدِّيَةُ وَالنَّطِيحَةُ وَمَا أَكَلَ السَّبُعُ إِلاَّ مَا ذَكَّيْتُمْ وَمَا ذُبِحَ عَلَى النُّصُبِ وَأَن تَسْتَقْسِمُواْ بِالأَزْلاَمِ ذَلِكُمْ فِسْقٌ الْيَوْمَ يَئِسَ الَّذِينَ كَفَرُواْ مِن دِينِكُمْ فَلاَ تَخْشَوْهُمْ وَاخْشَوْنِ الْيَوْمَ أَكْمَلْتُ لَكُمْ دِينَكُمْ وَأَتْمَمْتُ عَلَيْكُمْ نِعْمَتِي وَرَضِيتُ لَكُمُ الإِسْلاَمَ دِيناً فَمَنِ اضْطُرَّ فِي مَخْمَصَةٍ غَيْرَ مُتَجَانِفٍ لِّإِثْمٍ فَإِنَّ اللهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [المائدة: 3] وقال تعالى ﴿قُل لاَّ أَجِدُ فِي مَا أُوْحِيَ إِلَيَّ مُحَرَّماً عَلَى طَاعِمٍ يَطْعَمُهُ إِلاَّ أَن يَكُونَ مَيْتَةً أَوْ دَماً مَّسْفُوحاً أَوْ لَحْمَ خِنزِيرٍ فَإِنَّهُ رِجْسٌ أَوْ فِسْقاً أُهِلَّ لِغَيْرِ اللهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلاَ عَادٍ فَإِنَّ رَبَّكَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [الأنعام: 145] وقال جل وعلى ﴿إِنَّمَا حَرَّمَ عَلَيْكُمُ الْمَيْتَةَ وَالْدَّمَ وَلَحْمَ الْخَنزِيرِ وَمَا أُهِلَّ لِغَيْرِ اللهِ بِهِ فَمَنِ اضْطُرَّ غَيْرَ بَاغٍ وَلاَ عَادٍ فَإِنَّ اللهَ غَفُورٌ رَّحِيمٌ﴾ [النحل: 115] صدق الله العظيم.

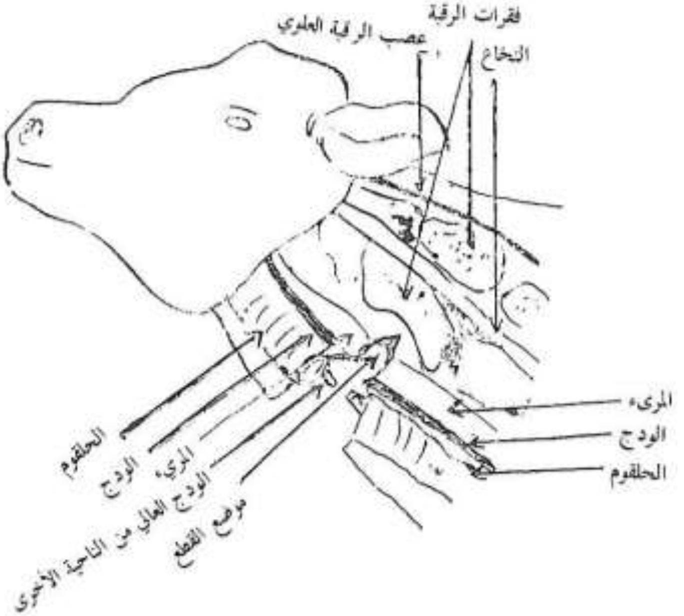
ويلزم للمتخصصين محاضرات طويلة لتوضيح الإعجاز العلمي في هذه الآيات الكريمات، لكن في هذه العجالة تُلخص الحكمة في تحريم ما حرم الله من مَيْتَةُ وَدَّمُ مسفوح وَلَحْمُ الْخِنْزِيرِ وغيره في كوّن أن الْمَيْتَة هي ما فُقِدَت حياتُها إما بسبب المرض وبالتالي يحتبس الدم في أنسجتها الداخلية بكل ما يحتويه من إفرازات سامه (فوظيفة الدم نقل العناصر الغذائية المهضومة إلى الخلايا التي تحتاجها، كذلك نقل الغازات الناتجة عن عمليات التبادل الغازي بالجهاز التنفسي ونقل المواد السامة الناتجة عن الأيض الخلوي من الخلايا إلى الكليتين، الجلد، الرئتين، والأمعاء للتخلص منها خارج الجسم)، كما أن الدم (في حالة الْمَيْتَة) أيضاً يحتوي على الأحياء المجهرية المرضية أو سمومها التي قد تكون سبب في موت الحيوان مما يؤدي إلى انتقال العدوى إلى من يتناول لحوم هذه الْمَيْتَة، وقد يكون سبب موتها هو الهِرم (الشيخوخة) وعندئذ تصبح أنسجتها الداخلية مُتليفة فاقدة لقيمتها الغذائية بل وتؤدي إلى إصابة من يتناول لحومها بعسر الهضم.

وقد يكون السبب في الموت أيضاً الاختناق (الْمُنْخَنِقَةُ) وبالتالي يتراكم غاز ثاني أكسيد الكربون السام في أنسجتها ليصل إلى حدود سامة، كذلك َالْمَوْقُوذَةُ وهي الحيوان الذي يضرب حتى الموت مما يودي إلى تلف الأنسجة، واحتوائها على الكثير من الأحياء المجهرية نتيجة احتقان الدم فيها وعدم ذبحها، أما الْمُتَرَدِّيَةُ فهي الحيوان الذي يموت من السقوط من مكان عال أو من جراء حادث سيارة، وكذلك النَّطِيحَةُ التي ماتت نتيجة نطح حيوان آخر لها، فتكونان كسابقتها (أي الْمَوْقُوذَةُ)، أما التي ماتت نتيجة افتراسها من أحد الجوارح (مَا أَكَلَ السَّبُعُ) فتتسبب الجروح التي حدثت أثناء افتراسها في تلوث أنسجتها بالأحياء المجهرية المرضية والتي عادة ما تكون في مخالب تلك الجوارح ولعابها. ويستثنى هنا ما تم تذكيته (إِلاَّ مَا ذَكَّيْتُمْ) أي تداركه قبل الموت والقيام بذبحه بالطريقة التي أمر بها الله جل و علا.

أما الدَّم المسفوح، فقد سبق الحديث عن احتواء الدَّم المسفوح على السموم الناتجة عن الأيض الخلوي وكذلك فالدم يشكل وسط ملائم لنمو الأحياء المجهرية المرضية وهذا ما تدركونه جيداً كطلبة في مجال علم الأحياء المجهرية.

أما فيما يخص َلَحْمُ الْخِنْزِيرِ فهذا الحيوان سبب في انتقال العديد من الأمراض والتي سبق الحديث عن بعضها في نهاية الفصل الثاني (على سبيل المثال لا الحصر) مثل داءُ الأَميبات **Amoebiasis**، وداءُ القِرْبِيَّات **Balantidiasis**، وداءُ الشَّراطِيَّات **Cestodiasis**، وداءُ المُقَوَّسات **Toxoplasmosis**، وداءُ الشَّعْرينات **Trichinellosis** .....إلخ.

وتخلف طرق الذبح عند الشعوب وذلك حسب المعقدات الدينية ففي الدين الإسلامي يكون الذبح بالسكين واستنزاف الحيوان بصورة كاملة دون إجراء تخدير **Immobilization** عند أجراء الذبح ترقد الماشية على جانها الأيسر ويقف الجزار خلف الرقبة حيث يمسك بمقدمة الفك الأسفل بيده اليسرى بشدة ثم يقطع (بعد التسمية والتكبير) الحلقوم والمريء والودجين دون سائر الرقبة، ويكون ذلك من الجهة الأمامية وليس من أحد جانبي الرقبة كما هو موضح بالشكل التالي:



الشكل رقم (150) يوضح ذبح الحيوانات بالطريقة الإسلامية، عن (الجليلي وأخرون، 1985).

وقد وجد أن للجهاز العصبي للحيوان دورا عند الذبح، فعند قطع الحلقوم والمريء والودجين دون سائر الرقبة (عدم فصل الرأس عن الحيوان في منطقة الفقرات العنقية) فإن تغذية المخ بالدماء تنقطع، فيقوم بإصدار إشارات إلى القلب لضخ مزيد من الدماء إلى الدماغ، فتتحرك العضلات في جسم الحيوان حركة تشنجية تقوم من خلالها بدفع الدماء إلى القلب الذي يقوم بدوره بضخ الدماء إلى الدماغ ولكن الدماء تندفع خارج جسم الحيوان بدلاً من صعودها إلى الدماغ بسبب الأوردة المقطوعة في الرقبة، وهكذا حتى تتم عملية اسْتِنْزاف الدم بصورة كفؤه واخراج أكبر كمية من الدم من جسم الذبيحة. أما إذا لم تتم عملية ذبح الحيوان وفقاً للشريعة الإسلامية وتم تخدير الحيوان بثاني أكسيد الكربون أو صعقه بالمسدس ذو الطلقة المسترجعة أو المسدس الصادم أو استخدام المطرقة أو طريقة الصدمة الكهربائية أو المغطس المائي المكهرب الخاص بالدواجن، فإن ذلك يحدث تهتك بالمخ أو يحدث نزيف داخلي فيه، ولا تكون هنالك حركة أو انقباضات للحيوان، بالتالي يتم احتجاز كمية أكبر من الدم في جسم الحيوان.

ويشير نوفل (1998) في كتابه الطريق إلى الغذاء الصحي إلى أنه "عند استخدام الكهرباء لوحظ وجود نقط حمراء داكنة (ناتجة عن النزيف) بداخل عضلات الأرباع الخلفية للحيوان نتيجة ارتفاع ضغط الدم في الأوعية الدموية في جسم الحيوان مما يؤدى إلى انفجار الأوعية الدموية الصغيرة المنتشرة داخل العضلات، ولم يثبت حدوث هذه الظاهرة إذا تم الذبح على الطريقة الإسلامية باستخدام بالسكين مباشرة وبدون استخدام مؤثرات لإفقاد الحيوان وعيه قبل الذبح. وقد لا تتمكن بعض الحيوانات أن تتحمل قوة التيار الكهربائي المستخدم، خاصة مع اختلاف نوع وجنس وعمر الحيوان، ونتيجة لذلك تحدث نسبة نفوق (ولو كانت ضئيلة) لحيوانات لم تتحمل قوة التيار الكهربائي المستخدم، فتصعق وتنفق قبل أن تمتد إليها ما يد السكين مما يصعب معه إدراك الحيوان النافق، فيتم اختلاط لحم الميتة الحرام باللحم الآخر إذا فُرض بجواز حله". كما يشير ايضاً إلى "أن مخالفة الطريقة الإسلامية للذبح بالسكين مباشرة، وذلك باستخدام أية مؤثرات أخرى (مسبقة) تسبب إيذاء للحيوان وإيلامه، بل ونفوقه، كما ينتج عنها عيوب بداخل جسم الحيوان، مثل النزيف بأنسجة العضلات، أو قد يحدث أن يعود الحيوان للوعي بينما يظل جسمه مشلولا، وذلك كما يحدث عند استخدام الصدمة الكهربائية للحيوان. إن الذبح بالسكين مباشرة لم تظهر له عيوب باللحوم وقد ثبت أنها الطريقة الأكثر رحمة لذبح الحيوان".

أما فيما يخص الدجاج ففي الدول غير الإسلامية يتم استخدام المغطس المائي المكهرب حيث تعلق من أرجلها بشريط آلي متحرك يجعل رؤوسها وأعناقها تمر بحوض مائي مكهرب فيتم صعقها ثم يمر الشريط على سكين آلية تذبحها (أو قد تذبح يدوياً) وهي على هذه الحالة، ونتيجة لاختلاف الطيور في تحملها لعملية الصعق فقد تؤدي هذه العملية إلى موت الطير قبل ذبحة، وبالتالي ينبغي التشديد على ذبح الطيور بدون استخدام هذه الطريقة.

وبعد عملية الذبح للطيور والتي تكون بقطع رقبتها واتمام عملية النزف تجرى عملية السمط Scalding للطيور بغمرها في ماء ساخن درجة حرارته حوالي 53°م لمدة 3 دقائق في حالة السمط الخفيف و 63°م لمدة 60 – 80 ثانية في حالة السمط الشديد، وتهدف هذه العملية إلى تسهيل إزالة الريش، ومن فوائد هذه العملية أنها تؤدي إلى خفض الحمولة الميكروبية على سطح ذباح الطيور وخصوصاً في حالة السمط الشديد، لكنها تؤدي إلى خفض طراوة لحم ذباح الطيور وحدوث تغيرات في لونها أثناء التجميد وسهولة مهاجمتها من الأحياء المجهرية المختلفة بعد هذه العملية، وبالتالي يفضل إجراء السمط الخفيف حيث تؤدى هذه الطريقة إلى الحصول على ذباح ذات جلد أبيض ناصع والمحافظة على طراوة لحومها.

وبعدها تتم عملية نزع ريش الذيل والجناحين أما يدوياً أو ميكانيكياً باستعمال مجموعة متتالية من الآلات ذات أصابع من الصلب مغطاه بقطع مطاطية، أو باستخدام حمامات الشمع وفي هذه العملية يتم غمر الدجاج بعد إزالة الريش الكبير في حمام شمع منصهر لمدة قصيرة ثم ترفع ويترك الشمع ليتصلب ثم ينزع الشمع الذي يزيل معه كل الريش المتبقي. ثم تتم عملية نزع الأحشاء والحويصلات، والرئة من ذبائح الطيور، وإذا كانت هذه الذبائح مجهزة للتجميد فيتم تنظيف الحويصلات وإعادة إدخالها في الذبيحة قبل تجميدها. وبعد الانتهاء من إزالة الأحشاء يمرر على الذبائح رذاذ من ماء بارد لتنظيفها، ثم يتم تبريد الدواجن بالماء أو الهواء في أنفاق التبريد.

مصادر تلوث اللحوم بالأحياء المجهرية:

باستثناء الأسطح الخارجية (الشعر والجلد) والقناة الهضمية والتنفسية فإن أنسجة الحيوان الحي خالية من الأحياء المجهرية أساساً، فكريات الدم البيضاء في الجهاز الدوري للحيوان وكذلك الأجسام المضادة التي يكونها الجسم خلال حياته تسيطر وبكفاءة على مصادر الإصابة في الجسم الحي، ولكن هذه الوسائل الدفاعية الداخلية تُفقد بعد الذبح.

إن بداية تلوث اللحوم بالأحياء المجهرية هو عند دخولها إلى الجهاز الدوري عند استعمال السكاكين غير المعقمة في عملية الذبح، فبالرغم من أن الدم يستمر في الدوران لفترة قصيرة جداً بعد الذبح لكن الأحياء المجهرية الداخلة عن طريق السكاكين غير المعقمة يمكن أن تنتشر في الكثير من مناطق جسم الحيوان المذبوح. كما يحدث التلوث بعد ذلك بسبب وصول الأحياء المجهرية إلى أسطح اللّحم في كل عملية تجري أثناء الذبح والتقطيع والتصنيع والخزن والتوزيع والتداول للّحوم. فيمكن أن تتلوث الذبيحة عن طريق تماس اللّحم مع الجلد أو الأرجل أو الأوساخ في الأحشاء الداخلية (إذا وخزت أو فتحت) أثناء عملية الذبح. ومن مصادر التلوث بالأحياء المجهرية أيضاً المعدات المستعملة في جميع عمليات تحضير المنتج النهائي للاستهلاك كذلك أيدي الأشخاص العاملين، وحتى الماء الذي يستعمل في غسل الذبائح والمعدات، كذلك الماء المستعمل في محاليل التقديد يمكن أن يكون مصدراً للتلوث أيضاً. وبنفس الطريقة يمكن أن يأتي التلوث من الأحياء المجهرية في الهواء في ثلاجات التبريد والخزن والتعتيق أو في غرف التصنيع والتعبئة. وبهذا يصبح واضحاً أن أي شيء يكون في تماس مع اللحوم (وبضمنها منتجات اللحوم الأخرى) يعد مصدراً قوياً للتلوث بالأحياء المجهرية، ويجب أن يكون واضحاً أيضاً أن إتباع طرق النظافة التامة هي أحسن وسيلة لتقليل التلوث بالأحياء المجهرية، وهنا يجب التأكيد على حقيقة أنه ليس هناك بديل للنظافة الجيدة في صناعة اللحوم. لأنه من المهم التقليل من الحمولة الميكروبية (كمية التلوث بالأحياء المجهرية) حيث أن ذلك عامل مهم في تحديد فترة صلاحية المنتج، وتحديد مدى تقبل منتجات اللحوم سواء كانت طازجة أو مصنعه.

والجداول التالية توضح أجناس الأحياء المجهرية المتواجدة بكثرة على اللحوم والدواجن.

جدول رقم (19): أجناس البكتيريا المتواجدة بكثرة على اللحوم والدواجن*

جنس البكتيريا	اللحوم	الدواجن	جنس البكتيريا	اللحوم	الدواجن
Acinetobacter	+ +	+ +	***Escherichia***	+	-
Aeromonas	+ +	+	***Lactobacillus***	+	-
Alcaligenes	+	+	***Leuconostoc***	+	-
Bacillus	+	+	***Listeria***	+	+ +
Campylobacter	-	+ +	***Micrococcus***	+	+ +
Clostridium	+	+	***Proteus***	+	+
Corynebacteriu	+	+ +	***Pseudomonas***	+ +	+ +
Enterobacter	+	+	***Salmonella***	+	+
Enterococcus	+ +	+	***Staphylococcus***	+	+

*المصدر (Jay *et al.*, 2005)، - = لا تقارير عنه + = معروف بتواجده، + + = تواجده أكثر تكراراً.

جدول رقم (20): أجناس الأعفان والخمائر المتواجدة بكثرة على اللحوم والدواجن*

أجناس الأعفان	اللحوم	الدواجن	أجناس الخمائر	اللحوم	الدواجن
Alternaria	+	+	***Candida***	+ +	+ +
Aspergillus	+	+	***Cryptococcus***	+	+
Aureobasidium	+	-	***Debaryomyces***	+	+ +
Cladosporium	+ +	+	***Hansenula***	+	-
Eurotium	+	-	***Pichia***	+	+
Fusarium	+	-	***Rhodotorula***	+	+ +
Geotrichum	+ +	+	***Saccharomyces***	-	+
Monilia	+	-	***Torulopsis***	+ +	+
Mucor	+ +	+	***Trichosporon***	+	+
Neurospora	+	-	***Yarrowia***	-	+ +
Penicillium	+	+			
Rhizopus	+ +	+			
Sporotrichum	+ +	-			
Thamnidium	+ +	-			

*المصدر (Jay *et al.*, 2005)، - = لا تقارير عنه + = معروف بتواجده، + + = تواجده أكثر تكراراً.

التغيرات التي تحدثها الأحياء المجهرية في اللحوم:

تتعرض اللحوم إلى تغيرات فيزيائية وكيميائية منذ لحظة ذبح الحيوان وأسباب هذه التغيرات تختلف فمنها ما يكون بسبب الإنزيمات الداخلية للّحوم ومنها ما يكون بسبب أكسدة الدهون ومنها ما يكون بسبب الأحياء المجهرية والتي تتسبب بفساد اللحوم **Spoilage** وإحداث حالة من التفسخ والتحلل **Decomposition** التي تجعل اللحوم غير صالحة للاستهلاك البشري. وتختلف تأثيرات التلف الميكروبي على حسب الظروف التي تنمو فيها تلك الأحياء المجهرية فهي قد تنمو في ظروف هوائية أو في ظروف لاهوائية.

أولاً- الفساد تحت الظروف الهوائية:

في الظروف الهوائية تنمو البكتيريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية وكذلك الخمائر والأعفان على السطح الخارجي للّحوم مسببة عديداً من المشاكل التي يمكن تلخيص أهمها فيما يلي:

1- لزوجة السطح:

تحدث لزوجة للسطح الخارجي للّحوم نتيجة لنمو الأحياء المجهرية والتي قد يصل عددها إلى 3×10^8 في السنتيمتر المربع الواحد، ويختلف نوع تلك الأحياء المجهرية تبعاً لدرجة الحرارة التي تحفظ عندها اللحوم.

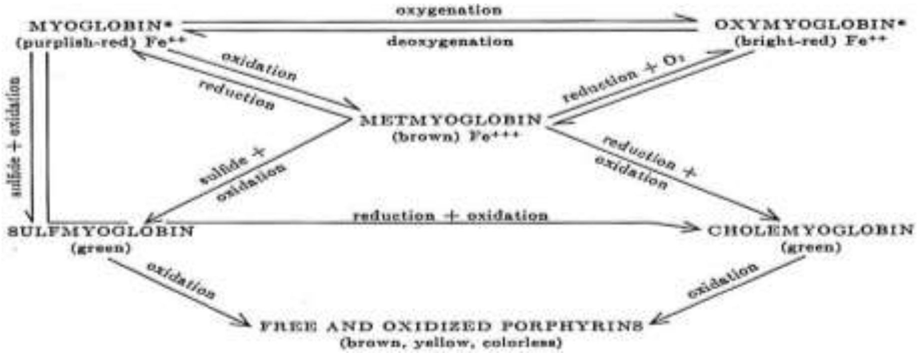
وعند حفظ اللحوم في درجات حرارية منخفضة فإن معظم تلك الأحياء المجهرية المسببة لهذا النوع من الفساد تتبع جنس *Pseudomonas* وجنس *Achromobacter*، في حين أنه عند حفظ اللحوم على درجة حرارة الغرفة أو في درجات حرارية معتدلة فإن الفساد يكون بسبب نمو جنس *Micrococcus* و/ أو جنس *Lactobacillus* و/ أو جنس *Bacillus*. وعادة ما تكون أعداد الخمائر في اللحوم قليلة مقارنة بأعداد البكتيريا لكن إذا ما أُتيحت الظروف الملائمة لنموها فإنها أيضاً قد تسبب لزوجة للسطح الخارجي للّحوم.

2- تغير اللّون الطبيعي للّحوم:

عرفنا سابقاً أن اللحوم تكتسب لونها من صبغة العضلات المُسماة الميوجلوبين **Myoglobin** وتتميز هذه الصبغة بلونها الأحمر الأُرْجُوَانِيّ المُميز للّحوم المذبوحة حديثاً، وتقدر كمية صبغة الميوجلوبين بين 80 – 90 % من المجموع الكلي للصبغات في الأنسجة العضلية المستنزفة من الدم بشكل جيد، ونتيجة لتعرض صبغة الميوجلوبين لأكسجين الهواء الجوي فإنها تكون صبغة أُوكْسِي ميوجلوبين **Oxymyoglobin** المتميزة بلونها الأحمر الفاتح (الوردي) المرغوب لدى المستهلك، وإذا ما تأكسدت صبغتي الميوجلوبين وأُوكْسِي ميوجلوبين فإنهما تكتسبان لون بُني نتيجة تكوين مركب معقد يعرف باسم ميتميوجلوبين **Metmyoglobin**.

ويحدث تغير في لون اللحوم نتيجة تكون المواد المؤكسدة بواسطة الأحياء المجهرية ومن أمثلة هذه المواد فوق أوكسيد الهيدروجين H_2O_2 أو نتيجة التفاعل المباشر بين اللحوم وإنزيمات الأحياء المجهرية أو إنتاج الأحياء المجهرية لكبريتيد الهيدروجين H_2S.......الخ. حيث يمكن أن يتغير اللّون الطبيعي للّحوم من اللّون الأحمر المعروف إلى اللّون الأخضر أو البني أو الرمادي نتيجة تكون معقدات أخرى مثل سلفاميوجلوبين **Sulfmyoglobin**، كولميوجلوبين **Cholemyoglobin**، وبُرفيرِينات حرة ومؤكسدة **Free & Oxidized Porphyrins**.

والشكل التالي يوضح أهم التغيرات اللّونية التي قد تحدث في اللحوم الطازجة.



الشكل رقم (151) التغيرات اللّونية التي قد تحدث في اللحوم، عن (Frazier, 1967).

ومن أهم الأحياء المجهرية المسببة لهذه التغيرات اللونية جنسي *Lactobacillus* و *Leuconostoc*، كما يمكن أن يتلون اللّحم بسبب نمو البكتيريا المنتجة للأصباغ عندما تنمو بشكل كثيف على سطح هذه اللحوم، مثل تكون اللّون الأحمر الذي قد يكون ناتج عن نمو بكتيريا *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*، أو تكون اللّون الأزرق نتيجة نمو أنواع من جنس *Pseudomonas*، أو تكون اللّون الأصفر نتيجة نمو أنواع بكتيريا من جنس *Flavobacterium* و *Micrococcus*. بالإضافة إلى التغيرات التي تحدثها الأعفان والخمائر والتي ينتج عنها تغير اللّون الطبيعي للّحوم.

3- التغيرات التي تطرأ على الدهون:

يؤدي نمو الأحياء المجهرية المحللة للدهون **Lipolytic Microorganisms** ومن أهمها هنا أنواع بكتيريا من جنس *Pseudomonas* و *Achromobacter* وبعض أنواع الخمائر إلى تحلل وتزنخ الدهون والشحوم في الذبيحة مما يعطي رائحة غير مقبولة وخاصة الناتجة من الأحماض الدهنية القصيرة السلسلة.

4- تغيرات أُخرى:

تتشكل روائح كريهة بسبب نمو البكتيريا على سطوح اللحوم قبل ظهور أي علامات أُخرى. وتنطلق عادة بعض المواد الطيارة التي تعزى إليها هذه الرائحة.

ثانياً- الفساد تحت الظروف اللاهوائية:

أما في الظروف اللاهوائية فتحدث العديد من التغيرات التي تتوقف طبيعتها على الحمولة الميكروبية للّحوم ونوع الأحياء المجهرية الملوثة ودرجة حرارة التخزين، وأهم هذه التغيرات يمكن تلخيصها فيما يلي:

1- تكون الحموضة:

يحدث هذا النوع من الفساد نتيجة تكون الأحماض العضوية مثل أحماض الفورميك والخليك والبيوتيريك والبروبيونيك واللاكتيك وغيرها، وهذا النوع من التغيرات قد ينشئ من أحد المسببات التالية:

1- فعل إنزيمات اللّحم نفسها أثناء عملية التعتيق.
2- تفسخ (تحلل) البروتينات.
3- نمو الأحياء المجهرية المنتجة للحموضة أو المحللة للدهون.

2- التفسخ:

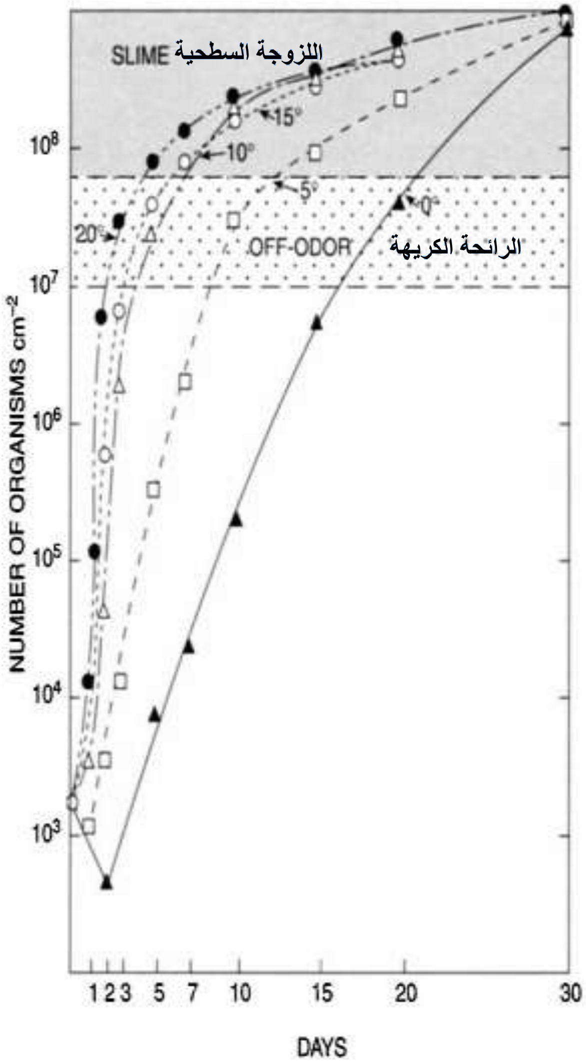
يقصد بالتفسخ Putrefaction تحلل البروتينات في الظروف اللاهوائية ويترافق ذلك مع إنتاج مركبات ذات رائحة كريهة مثل غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S والمركبتانات Mercaptans والإندول والنشادر.......الخ. وغالباً ما يسبب هذا النوع من الفساد بكتيريا *Clostridium*، غير أن هناك بكتيريا أُخرى عادة ما تتبع أجناس *Pseudomonas* و *Achromobacter* يمكن أن تسببه أو تساهم في حدوثه.

العوامل التي تؤثر على فعالية الأحياء المجهرية في اللحوم:

كما تمت الإشارة إلى ذلك سابقاً، من بين العوامل التي تؤثر في نمو الأحياء المجهرية في اللحوم الخواص الداخلية للّحوم مثل كمية الرطوبة والأس الهيدروجيني وجهد التأكسد والاختزال والقيمة الغذائية وغياب المواد المضادة للأحياء المجهرية، إضافة لذلك فالعوامل الخارجية مثل درجة الحرارة والرطوبة النسبية ووجود أو غياب الأوكسجين والشكل الفيزيائي للّحم (فيما إذا كان ذبيحة متكاملة أو قطعاً لحمية كبيرة أو صغيرة أو فيما إذا كان بالشكل المفروم) تؤثر في نمو الأحياء المجهرية أيضاً. والعوامل ذات التأثير الأكبر على نمو الأحياء المجهرية في اللحوم ومنتجاتها هي درجة حرارة الخزن وتوفر الرطوبة والأوكسجين.

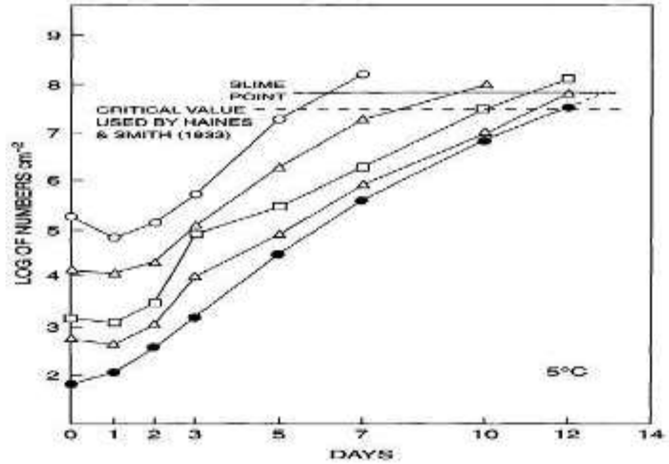
إن التأثيرات التي يتركها أي من العوامل على فعالية الأحياء المجهرية كدرجة الحرارة والأوكسجين والأسى الهيدروجيني والنشاط المائي لا تكون مستقلة تماماً عن بعضها، فعند درجة الحرارة اللازمة للنمو الأدنى أو الأقصى تصبح الأحياء المجهرية بصورة عامة حساسة للنشاط المائي وتوفر الأوكسجين والأس الهيدروجيني. فمثلاً تحت الظروف اللاهوائية يمكن أن تحتاج البكتيريا الاختيارية أس هيدروجيني متعادل وفعالية ماء عالية ودرجة حرارة دنيا بالمقارنة مع الوقت الذي تسود فيه الظروف الهوائية.

اعتيادياً تكون الأحياء المجهرية التي تنمو على درجة حرارة واطئة هوائية وهي بصورة عامة تحتاج إلى متطلبات عالية من النشاط المائي وبذلك فإن تخفيض فعالية الماء بإضافة الملح أو إزالة الأوكسجين من اللحوم المحفوظة على درجة حرارة واطئة يقلل بدرجة كبيرة من سرعة التلف الميكروبي. اعتيادياً يحدث بعض النمو الميكروبي عندها يكون أي من العوامل التي تحدد سرعة النمو في مستوى محدود، ولكن إذا حُدد عاملان أو أكثر فإن النمو يتأثر بدرجة كبيرة أو قد يتوقف تماماً. والشكل التالي يوضح تأثير درجة حرارة التخزين على معدل نمو الأحياء المجهرية على لحم الأبقار المخزن على درجات حرارية مختلفة.



الشكل رقم (152) تأثير درجة حرارة التخزين على معدل نمو الأحياء المجهرية على لحم الأبقار المخزن على درجات حرارية 0°م و5°م و10°م و15°م و20°م، عن (Lund *et al.*, 2000).

وكما أُشير إليه سابقاً تكون الحمولة الميكروبية الأولية للّحوم عامل محدد لجودة هذه اللحوم المنتجة وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الشكل رقم (153) العلاقة بين الحمولة الميكروبية الأولية للحم الأبقار المخزن على درجة حرارة 5°م والوقت اللازم لظهور الفساد اللزج في هذا اللّحم، عن (Lund *et al.*, 2000).

طرق حفظ اللحوم ومنتجاتها:

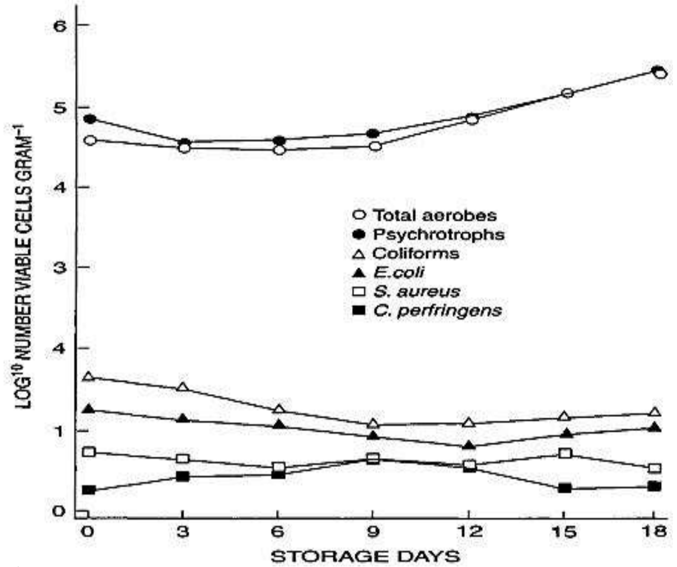
يتم حفظ اللحوم من الفساد الميكروبي والتغيرات الكيميوحيوية والفيزيائية بإحدى الطرق التالية:

1- منع التلوث: يفيد منع تلوث اللحوم في جعل عملية الحفظ سهلة مهما كانت الطريقة المتبعة في ذلك، ويتم ذلك بتجنب التلوث بقدر المكان من الأجزاء الخارجية للحيوان (فقد أوصى بغسل الحيوان قبل سلخه وذلك للتخلص ما أمكن من الأوساخ العالقة بالشعر والجلد والحوافر) ومع هذا الإجراء يبقى الجلد والشعر مصدرين هامين لتلوث الذبيحة أثناء سلخها. ومن مصادر التلوث الأُخرى التي يجب استبعادها سكاكين السلخ، وثياب العمال وأيديهم، وهواء المسلخ، وأحشاء الحيوان، وجدران المسلخ والماء المستخدم في عمليات النظافة، وطاولات التقطيع ومختلف الأدوات والمعدات المستخدمة في هذه العمليات بمختلف أشكالها وأنواعها، ومواد وأدوات التغليف.

2- استخدام الحرارة: تصنف معظم أنواع اللحوم مع مجموعة الأغذية قليلة الحموضة وهي تشكل بيئة ممتازة للأحياء المجهرية الملوثة لها. وتقسم اللحوم المعلبة تجاريا إلى قسمين رئيسيين بناء على أسلوب المعالجة الحرارية المتبع وهي (1) اللحوم التي تعامل حراريا في محاولة لتعقيم محتويات العلبة تعقيما كاملا، أو على الأقل تعقيما تجاريا يمكن من الاحتفاظ باللحوم المعلبة لفترات طويلة دون فسادها. (2) اللحوم التي تعامل حراريا بما يكفي القضاء على جزء من الأحياء المجهرية المسببة للفساد مع الاحتفاظ بالناتج مبردا كي يحول دون حدوث الفساد كما هو الحال بالنسبة لمنتج اللانشون المعلب **Canned Luncheon Meat** مثلا.

3- <u>استخدام درجات الحرارة المنخفضة</u>: ويمكن أن يتم بإحدى هذه الوسائل:

(أ) <u>التبريد</u>: حيث تحفظ الذبائح مثلجة في درجات حرارة تتراوح بين 1.4° - 2.2°م مع تفضيل الدرجة الأدنى، وذلك لمدة حوالي ثلاثة أيام بالنسبة للّحوم البقر، ويتوقف ذلك على عدد الأحياء الموجودة ودرجة الحرارة والرطوبة النسبية. أما لحوم الضأن فيمكن الاحتفاظ بها لمدة أسبوع إلى أسبوعين، والشكل التالي يوضح تأثير درجة حرارة التخزين عند -1.7° ± 0.6°م لمدة 18 يوماً على المحتوى الميكروبي للّحم الأبقار المفروم، حيث لا تحدث تغيرات كبيرة في أعداد الأحياء المجهرية المختلفة.



الشكل رقم (154) يوضح تأثير درجة حرارة التخزين عند -1.7° ± 0.6°م لمدة 18 يوماً على المحتوى الميكروبي للّحم الأبقار المفروم، عن (Lund *et al.*, 2000).

وكما ذُكر سابقاً بأنه يمكن إطالة فترة التخزين من خلال إزالة الأوكسجين من اللحوم المحفوظة بالتبريد من خلال إضافة ثاني اوكسيد الكربون CO_2 أو الأوزون أو النيتروجين إلى جو غرفة التخزين. حيث وجد بأنه أمكن مضاعفة مدة الاحتفاظ باللحوم المُبردة عند إتباع اسلوب التخزين الغازي بثاني اوكسيد الكربون بنسبة تتراوح بين 10 - 30 %، ولغاز الأوزون (بمعدل 2,5 - 3 أجزاء في المليون) أمكن إطالة مدة التخزين حتى 60 يوما في درجة حرارة 2,2°م ورطوبة نسبية مقدارها 92 % دون حدوث أي نمو فطرى، غير أن الأوزون قد يكسب الدهن نكهة زنخة نظراً لأنه غاز مؤكسد وبالتالي تم التقليل من استخدامه.

(ب) <u>التجميد</u>: تقتل عملية التجميد حوالي نصف أعداد البكتيريا الموجودة أصلاً، ويستمر عددها بالانخفاض أثناء التخزين بالتجميد، لكن يبقى عدد كبير من البكتيريا حياً بحيث أنها يمكن أن تتابع نموها ونشاطها أثناء الإذابة إذا أُجريت ببطء.

4- الحفظ باستخدام الأشعة فوق البنفسجية: يمكن حفظ اللّحوم المثلجة أو المبردة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ويتبع ذلك رئيسيا بمعالجة أنصاف الذبائح أو الكتل اللحمية الكبيرة لخفض عدد الأحياء المجهرية الموجدة على سطوحها، أو في هواء غرفة التخزين. وتكمن أهمية استخدام الأشعة فوق البنفسجية في عملية تعتيق اللحوم Aging التي تتم في فترة قصيرة (2 – 3 أيام) نظراً لأنها تكون في درجات حرارة تتراوح بين 15° - 18°م ورطوبة نسبية تتراوح بين 85 – 90 %، في حين أن عملية التعتيق العادية كما ذُكر سابقاً تكون بحفظ ذبائح اللحوم لعدة أسابيع في درجة حرارة 2,2 ° - 3,3°م ورطوبة نسبية تتراوح بين 80 – 90 %.

5- التجفيف والتمليح (التقديد): تقدد اللحوم لحفظها منذ قرون عديدة، وكان فيما سبق يقرن تقديد اللحوم بتمليحها وتدخينها، وخلال الحرب العالمية الثانية جففت شرائح لحم البقر بتعريضها للحرارة وأُحتفظ بالناتج النهائي دون حاجة لتبريده. كما أن هذه الطريقة كانت من الممارسات التقليدية لحفظ لحوم الذبائح في أيام الأعياد في كثير من مناطق اليمن قبل انتشار الثلاجات والمجمدات المنزلية.

6- الإضافات الكيميائية: وهنا تعامل اللحوم بإضافة بعض المواد الكيميائية، ومن أهم المواد المسموح باستخدامها كإضافات كيميائية للّحوم ما يلي:

(أ) كلوريد الصوديوم NaCl: الوظيفة الرئيسية للملح هي خفض النشاط المائي a_w، ويستخدم عادة كمحلول تغمر فيه اللحوم ويعرف بالمحلول الغامر ويحتوى على الملح بتركيز 15 %، أو كمحلول يحقن في داخل نسيج اللّحم يعرف بمحلول الحقن ويصل تركيز الملح فيه إلى 24 %.

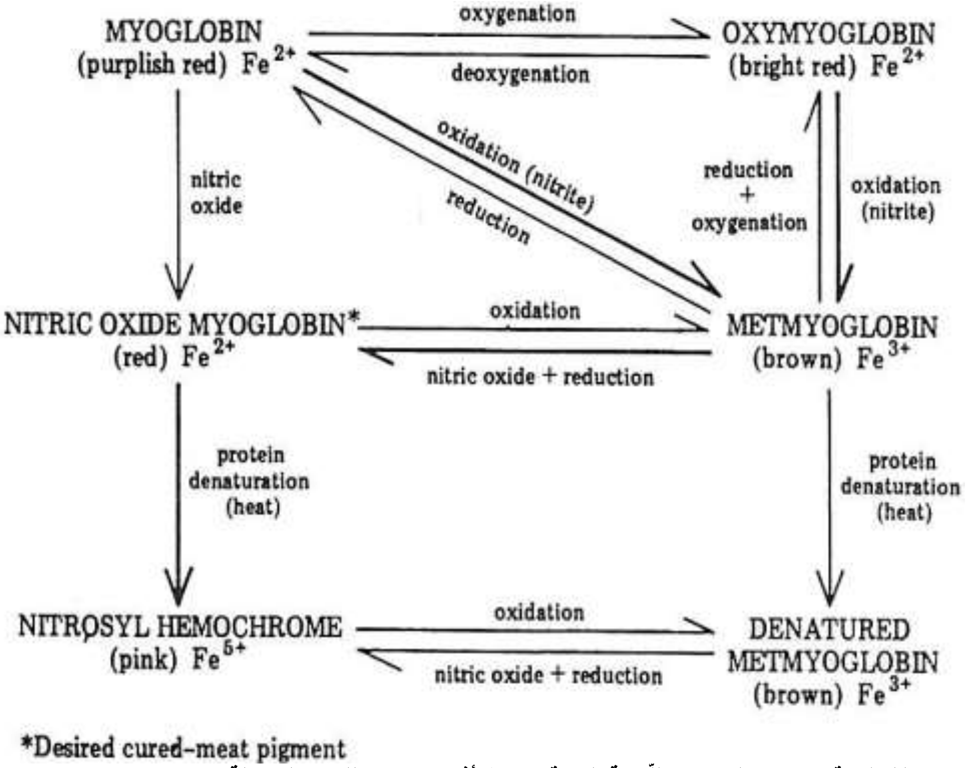
(ب) نترات الصوديوم $NaNO_3$: وتضاف كمادة مثبتة للّون في اللحوم، ويرجع إليها ذلك الأثر المرغوب على اللّون والطعم المميز للّحوم المعاملة. أما تأثير النترات على الأحياء المجهرية فهو محدود، ولكن في منتجات اللحوم المعاملة تتحول النترات إلى نتريت عن طريق الأحياء المجهرية (الموجودة فيها أو المستخدمة كبادئ في منتجات اللحوم المتخمرة)، حيث يعزى التأثر المضاد للأحياء المجهرية للنترات إلى النتريت المتكون منها. وقد تستخدم نترات البوتاسيوم KNO_3 كبديل لنترات الصوديوم. وتستخدم النترات في صورة جافة أو على هيئة محلول، وعند التتبيل أو المعالجة يتم دعك كميات كبيرة من خليط من ملح المعالجة (الذي يحتوى على النترات وملح الطعام والسكر) على اللّحم، ثم تُوضع قطع اللّحم التي تمت معاملتها في وعاء التتبيل تحت ضغط، ونتيجة للضغط الأسموزي يسحب الملح كمية من السائل الموجود في اللّحم إلى الخارج بحيث يغطى اللّحم.

(ج) نتريت الصوديوم $NaNO_2$: في الوقت الذي يم فيه معالجة القطع الكبيرة من اللحوم بأملاح النترات فأن أملاح النتريت تستخدم فقط في معالجة السجق ومنتجات اللحوم المصنعة من اللحم المفروم . مع العلم بأن المعالجة باستخدام النتريت يعتبر اقتصادياً بالمقارنة بالنترات، وذلك لأن المعالجة تتم بوقت أسرع.

وتضاف أملاح النترات والنتريت إلى منتجات اللحوم المصنعة إما كلا على حده أو على هيئة مزيج من هاتين المادتين وذلك لعملية حفظ المنتجات ولتكوين اللون الوردي المرغوب فيها، (وقد تم سابقا استخدام نترات الصوديوم أو البوتاسيوم ثم اكتشف لاحقا أن استعمال النتريت يؤدى إلى نفس النتيجة المرغوبة وبوقت أسرع) حيث يتم اختزال النترات إلى نتريت ثم إلى أوكسيد النتريك قبل حدوث التغيرات لإنتاج اللون المرغوب فيه، الذي يتكون وفقا للمعادلة:

Nitrosyl Hemochrome ← Nitric Oxide Myoglobin ← Nitric Oxide + Myoglobin

حيث تعتبر النتريت مصدر أوكسيد النتريك الذي يعتبر المثبت اللّوني الحقيقي في منتجات اللحوم المصنعة. والشكل التالي يوضح التغيرات اللّونية التي قد تحدث أثناء تصنيع اللحوم المعاملة.



الشكل رقم (155) التغيرات اللّونية التي قد تحدث أثناء تصنيع اللحوم المعاملة، عن (Frazier & Westhoff, 1997).

وكما سبقت الإشارة إلى أن اللحوم الطازجة تتميز باللون الأحمر الوردي لوجود صبغة الميوجلوبين **Myoglobin**، والتي تتحول بعد تقطيع اللحوم نتيجة اتحادها بالأوكسجين إلى الاوكسي ميوجلوبين **Oxymyoglobin** ذو اللون الأحمر الزاهي، وإذا تعرضت قطعة اللّحم إلى الأوكسجين لفترة أطول تكونت صبغة الميتميوجلوبين **Metmyoglobin** ذات اللون الرمادي أو البني، وإذا حدث تفاعل ما بين النتريت وكل من الميوجلوبين أو الاوكسي ميوجلوبين أو حتى الميتميوجلوبين تحت ظروف اختزالية ملائمة فإن النتريت تحل محل الأوكسجين ويتكون المركب المعروف بالنيتروزوميوجلوبين **Nitrosomyoglobin** أو أوكسيد النتريك الميوجلوبيني **Nitric Oxide Myoglobin**، وعند طبخ اللحوم المحتوية على هذا المركب فأنه يحدث دنترة للبروتين ويتكون مركب النيتروسيل هيموكروم **Nitrosyl Hemochrome**، والمركبين الأخيرين ذو لون قرنفلي أو أحمر وهما أكثر ثباتا من مركب الاوكسي ميوجلوبين وأقل تعرضاً للأكسدة ولا يكونان مركب الميتميوجلوبين ذي اللون الرمادي أو البني.

وقد حددت التشريعات أنه لا تزيد كمية النتريت في منتجات اللحوم عن **200** جزء في المليون (**ppm**)، كذلك لا يجب أن تزيد كمية النترات عن **500** جزء في المليون (**ppm**) في المنتج النهائي لأنها تعد مصدرا قويا لكميات إضافية من النتريت. والنتريت تكون مادة سامة إذا استهلكت بكميات كبيرة، فالجرعة من النتريت التي تزيد عن **15 – 20** مجم/كجم من وزن الجسم يمكن أن تكون مميتة، ولكن الكميات المسموح بها من النتريت في منتجات اللحوم أقل بحوالي عشرين إلى أربعين مرة عن هذه الجرعة، وبالتالي فإن الكميات المضافة تكون بالحدود الآمنة إذا ما اتبعت المواصفات والتشريعات الموصى بها. ولكن المشكلة الكبرى في إضافة النتريت هو إمكانية تكون مركبات النيتروزامينات **Nitrosamins** ($R_2N\text{-}NO$)، والتي تعتبر من المركبات المسرطنة **Carcinogenic**، وتتكون هذه المركبات نتيجة التفاعل بين النتريت والأمينات الثانوية **Secondary amines** كالتالي: $H_2O + R_2N\text{-}NO \leftarrow NO_2 + R_2NH$

وتشير البحوث إلى أن عدد من العلماء لم يجدوا في اختباراتهم أي نيتروزامينات في السجق المحتوى على النتريت والمنتج بالطريقة التجارية، كما تشير تقارير أخرى إلى أنه تم عزل مركبات النيتروزامينات من بعض منتجات اللحوم المصنعة وبصورة عامة بمستوى أقل من **50** جزء بالبليون (**ppb**)، وهى تركيزات أقل بكثير من الحدود التي يعرف أنها تسبب السرطان لحيوانات التجارب (لكن تأثير الجرعات المتناهية جداً في الصغر ولفترة طويلة من الزمن لم تدرس إلى الآن)، في حين كانت غالبية النماذج التي فحصت سالبة.

ولكن ينبغي أن يُعلم أن من الممكن تكوّن هذه المركبات خصوصاً عند استخدام كميات كبيرة من النتريت في هذه المنتجات، وهذا ما قد يحدث مع بعض المنتجين الذين يلجئون إلى زيادة كمية النتريت المضافة لإطالة فترة حفظ منتجاتهم، ويمكن التقليل من تكوين هذه المركبات عند إضافة أملاح حامض الاسكوربيك (الاسكوربات **Ascorbate**) حيث تشير البحوث إلى أن التراكيز الكافية من حامض الاسكوربيك أو اسكوربات الصوديوم تقلل أو تمنع تكون النيتروزامينات.

7- التدخين: تستخدم عملية التدخين في اللحوم المتخمرة لغرض إطالة مدة حفظ هذه المنتجات وإكسابها صفات عضوية حسية خاصة مرغوبة من حيث اللون والطعم والنكهة وغيرها، ووفقا للأبحاث المنشورة يوجد حوالي 300 مركب كيميائي شخصت في دخان الأخشاب المستخدمة في عملية التدخين معظمها تنتمي إلى مجاميع الكاربونيل (الديهيدات وكيتونات) والأحماض العضوية والفينولات والكحولات قصيرة السلسلة وبعض الهيدروكربونات (تشمل المركبات الأروماتية متعددة الحلقات) إضافة إلى الغازات المختلفة مثل O_2 و N_2 و CO و CO_2. وقد وجد أن معظم هذه المركبات تؤدي إلى قتل أو تثبيط أو تأخير نمو الأحياء المجهرية المسببة للفساد أو تلك التي تسبب تأثيرات ضارة على صحة المستهلك، وخصوصاً بكتيريا *Escherichia coli* و بكتيريا *Staphylococcus aureus* subspecies *aureus* و كذلك أبواغ *Clostridium botulinum*. في حين تعتبر الفطريات الخيطية (الأعفان) مقاومة لتأثير التدخين فهي تتمكن من النمو على سطح المواد الغذائية المدخنة مثل اللحوم والأسماك المدخنة. ولهذه المركبات الموجودة في الدخان تأثيرات مختلفة على جودة المنتجات المدخنة يمكن تلخيصها في أربعة أنواع من التأثيرات هي:

أ) مركبات تمنع فقدان القيمة الغذائية للمنتجات المدخنة من خلال تثبيط التغيرات الكيميائية والحيوية غير المرغوبة.

ب) مركبات لا تظهر تأثيرا من ناحية القيمة الغذائية (وهي مركبات محدودة).

ج) مركبات تتفاعل مع مكونات الغذاء وتقلل القيمة الغذائية للمنتجات المدخنة.

د) مركبات سامة.

وكمثال على النوع الأول من التأثيرات فإنه يستفاد من خواص مركبات الدخان المضادة للأحياء المجهرية في حماية هذه المنتجات من تأثير هذه الأحياء على القيمة الغذائية (الهدم الحيوي) للمنتجات المدخنة، كذلك فإن لبعض مركبات الدخان فعالية في مقاومة التغيرات التأكسدية لبعض العناصر الغذائية مثل الدهون والبروتينات وهدم بعض الفيتامينات، وذلك يعود للمركبات الفينولية التي تكون مسئولة بصورة رئيسية عن الخواص المقاومة للتأكسد في الدخان، وهذه خاصية مهمة تمنع فقدان القيمة الغذائية للمنتجات المدخنة بسبب تأكسدها.

أما بالنسبة للنوع الثاني والثالث من التأثيرات فإن التدخين يسبب فقد القيمة الغذائية بسبب فعل الحرارة المصاحبة لعملية التدخين وحركة الغازات وتفاعل مكونات الدخان مع المركبات الغذائية.

أما النوع الرابع فإنه نتيجة لعملية التدخين تتكون بعض المركبات السامة التي تنتمي إلى مجموعة الهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات فقد تم فصل وتشخيص أكثر من ستة عشر مركبا من هذه المركبات من المنتجات المدخنة من قبل العديد من الباحثين، ومن أبرز هذه المركبات مركب البنزوبيرين (3,4-benzopyrene) الذي يعرف بتأثيره المكون للسرطان، ويعد تركيز مقداره ميكروجرام/كيلوجرام واحد من الغذاء المدخن هو أعلى حد يسمح به من هذا المركب. ولتقليل نسبة هذا المركب إلى الحدود الآمنة يجب استخدام طرق تدخين جيدة، مثل استخدام طريقة التدخين البارد، حيث تقل نسبة مركب البنزوبيرين في الغذاء المعامل بهذه الطريقة مقارنة بالغذاء المعامل بطريقة التدخين الساخن، حيث افترض بعض الباحثين أن هذه المركبات تتكون في الدخان من مجاميع المثيلين المتولدة حراريا، وبالتالي فإنه من الممكن إزالتها أو تقليلها في الدخان باستخدام درجة حرارة منخفضة. كما افترضت عدة طرق لتقليل كمية هذه المركبات مثل استخدام المرشح الإلكتروستاتيكى الذي يقلل من كمية مركب البنزوبيرين في الدخان وقد وجد أنه حتى باستخدام الترشيح البسيط خلال نسيج قطني فإن 90 % من الهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات يتم إزالتها، كذلك فإن استخدام الدخان السائل يعتبر فعالاً في هذا المجال حيث لوحظ أن كمية الهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات تقل لحد كبير في عمليات تحضير الدخان السائل.

الحدود الميكروبيولوجية للّحوم والدواجن ومنتجاتهما وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

في ختام هذا الفصل لابد من التعرف على الحدود الميكروبيولوجية للّحوم ومنتجاتها وفقاً لما ذكرته المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) والمشتقة عن المواصفة القياسية السعودية رقم (1998/1556) التي اعتمدتها الهيئة اليمنية للمواصفات والمقاييس وضبط الجودة كمواصفة قياسية يمنية دون إدخال أي تعديلات فنية عليها، وسيتم اختتام كل فصل من الفصول اللاحقة لميكروبيولوجيا الأغذية بالجزء الخاص به من هذه المواصفة، وفيما يلي الجزء الخاص باللحوم والدواجن ومنتجاتهما من نص المواصفة القياسية، مع ذكر مقدمة المواصفة والتعاريف وأحكام القبول والرفض....الخ حتى لا يتم تكرارها في الفصول التالية:

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384 الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية - الجزء الأول (م. ق. ي 2002/384)

المقدمــة

قامت الهيئة اليمنية للمواصفات والمقاييس وضبط الجودة بتبني المواصفة القياسية السعودية رقم (1998/1556) "الحدود الميكروبيولوجية للسلع الغذائية - الجزء الأول"، وتم اعتمادها كمواصفة قياسية يمنية دون إدخال أي تعديلات فنية عليها.

تقــديم

توضح هذه المواصفة القياسية الخليجية الحدود الميكروبيولوجية لبعض الأغذية وكذا المكونات التي تستخدم كخامات للتصنيع الغذائي وقد وضعت هذه الحدود لأغلب المجموعات في صيغة مشابهة لما اتبعته اللجنة الدولية للمواصفات الميكروبيولوجية للأغذية. ولقد تم اختيار الميكروبات أو المجموعات الميكروبية لكل غذاء أو مكون طبقاً للعوامل التالية:

1- الضرر الصحي المتوقع عند استهلاك غذاء ملوث بهذا الميكروب أو المجموعة الميكروبية.
2- المعلومات المتوفرة بشأن المعاملات التي يتعرض لها المنتج الغذائي وعن ظروف تخزينه ونقله وتداوله.
3- نوع المتغيرات أو الفساد المتوقع للمادة الغذائية.
4- الظروف المناخية المحيطة بإنتاج الغذاء أو بتسويقه.

وقد وضعت هذه الحدود في شكل نظام يعرف بخطة تشغيل العينة يوضح درجات القبول والرفض وعدد العينات الواجب تحليلها. وتعبر هذه الصيغة أيضاً عن درجات التشدد طبقاً لنوع الغذاء والغرض المستخدم. فمثلاً الأغذية التي تنتج لمجموعات خاصة من المستهلكين ذوي الدرجة العالية من الحساسية كالأطفال والرضع والشيوخ. أو الأغذية المنتجة للاستعمالات الخاصة أو المجالات الطبية مثل المنتجات ذات المحتوى المنخفض من الطاقة أو الدهن أو الأغذية التي تعد للمستشفيات ودور العلاج وأغذية الاستشفاء أو فترات النقاهة نجد أن المتطلبات الميكروبيولوجية

تكون أكثر تشدداً من غيرها. وقد روعي أن تكون الحدود في نطاق يمكن الوصول إليه في وحدات الإنتاج بإتباع شروط حسن الأداء التصنيعي GMP ودفعات الغذاء التي لا تنطبق عليها الحدود الميكروبيولوجية المنصوص عليها في هذه المواصفة.

الحدود الميكروبيولوجية للسلع الغذائية - الجزء الأول

١- المجـــال

تختص هذه المواصفة القياسية الخليجية بالحدود الميكروبيولوجية للمنتجات الغذائية التي تعد للإستهلاك الآدمي وكذلك بعض المواد التي تستخدم في التصنيع الغذائي.

٢- التعـــاريف

١/٢ خطة تحليل العينة

خطة مختبرية تنظم عدد العينة (ع) التي يجب تحليلها من المنتج ومستويات القبول أو الرفض وحدود التجاوز. وتتضمن هذه الخطة ما يلي :

ع : عدد وحدات العينة التي يجب تحليلها .

م : مستوى الحد الميكروبي المطلوب تحقيقه في المنتج .

ق : أقصى عدد من وحدات العينة يسمح فيه بأن يعطي رقم أكبر من قيمة (م) ولا تصل إلى قيمة (ص)

ص : أقصى قيمة للحد الميكروبي يجب ألا يصل إليها أو يزيد عنها أي وحدة من (ع).

وحدة العينة:

هي عينة من المنتج الغذائي تختبر كوحدة من (ع) وهي إما عبوة منفردة أو جزء من عبوة أو مخلوط مركب من المنتج.

٢/٢ العينة المعيبة:

وحدة العينة التي تعطي قيمة للحد الميكروبي تساوي أو أعلى من قيمة (ص)

٣/٢ قبول حدي عينة تعطي قيمة للحد الميكروبي أكبر من (م) ولكنها أقل من (ص).

٤/٢ بكتيريا *Staphylococcus aureus*: يقصد عندما تذكر بالتي تعطي نتيجة موجبة في اختبار إنزيم التخثر.

٥/٢ بكتريا الفساد الخيطي اللزج في الخبز وبعض منتجات المخابز:

هي بكتيريا تتبع جنس الباسيلي المتجرثم تسبب قوام خيطي لزج بتحليها لبروتينات الخبز أو للكربوهيدرات أو كليهما.

٦/٢ البكتيريا المسببة للإحمضاض المستوي في المعلبات:

هي بكتيريا تعمل على الغذاء داخل العلبة وتنتج حمض بدون غاز وبذلك تبقى اطراف العلبة (الغطاء والقاع) مستوية بينما تتدهور جودة المنتج من الداخل.

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (21): الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية

اللحوم والدواجن ومنتجاتهما

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
لحوم مجمدة: كاملة، أنصاف ذبائح، قطع مع أو بدون عظم	Total Bacterial Count	5	3	10^6	-
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7	5	صفر	صفر	-
لحوم طازجة مبردة: كاملة، أنصاف، قطع مع أو بدون عظم	Total Bacterial Count	5	3	10^6	10^7
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
لحم مفروم مبرد	Total Bacterial Count	5	3	10^6	10^7
	Staphylococcus aureus	5	2	5×10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
لحم مفروم مجمد	*Salmonella*	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7 (٢٥ غم من العينة)	5	صفر	صفر	-
لحوم غير مطبوخة مبردة ومجمدة - لحم مفروم مع الصويا ومنتجات الكبة - كرات اللحم - السجق الطازج - أو لحم البرجر.	*Staphylococcus aureus*	5	2	5×10^2	10^3
	Total Bacterial Count	5	3	10^6	10^7
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7	5	صفر	صفر	-
أجزاء من الذبيحة مثل الكبد، خصي، كلاوي، قوانص مجمدة	Total Bacterial Count	5	3	5×10^5	10^7
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
لحوم مملحة و/أو مدخنة المرتديلا، اللانشون، البسطرمة.	*Staphylococcus aureus*	10	2	10^3	10^4
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7	5	صفر	صفر	-
السجق المطبوخ	Total Bacterial Count	5	3	10^4	10^5
	Staphylococcus aureus	5	1	10^3	10^4
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
لحوم مجففة - منتجات ومركزات البروتين المشتقة من اللحوم	*Clostridium perfringens*	5	1	10^2	10^3
	Staphylococcus aureus	5	1	10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
شوربة اللحم بأنواعها	Total Bacterial Count	5	1	10^4	10^6
	Coliform Count	5	2	10	10^2
	Clostridium perfringens	5	1	10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
دواجن مبردة أو مجمدة	Total Bacterial Count	5	3	10^6	10^7
	Salmonella	5	صفر	صفر	-

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
لحم دواجن معامل بالتمليح مع أو التدخين، منتجات دجاج في صورة مرتديلا، فرانكفورتر، بسترامي، ديك رومي، صدر ديك رومي مدخن	*Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5	1 صفر	10^3 صفر	10^4 -
لحم دجاج مطبوخ، وجبات جاهزة من الدجاج، برجر وفطائر ورغيف الدجاج (منتجات تسوق مجمدة).	*Staphylococcus aureus* *Salmonella* *Escherichia coli* **O157:H7**	5 5 5	1 صفر صفر	10^3 صفر صفر	10^4 - -
لحم الدواجن المطبوخ المجمد الجاهز للأكل مثل لفائف الرومي والدجاج.	Total Bacterial Count *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5	3 1 صفر	10^4 10^3 صفر	10^5 10^4 -
منتجات من لحوم الدجاج مجففة أو مركزة	*Salmonella*	5	صفر	صفر	-

الفصل السادس

ميكروبيولوجيا الأسماك والقشريات Fish & Shellfish Microbiology

تتكون لحوم الحيوانات البحرية (الأسماك والقشريات) في الغالب من عضلة واحدة، وتقسم الأسماك إلى: (1) أسماك لحمية وهى أسماك لحمها أبيض متماسك ونسبة الدهن فيها منخفضة، (2) أسماك دهنية تكون أنسجتها اللحمية داكنة اللون ونسبة الدهن فيها عالية، (3) القشريات أو الأصداف التي تعتبر من الأسماك قليلة الدهن وبالتالي فإن لحمها أبيض. وتمتاز لحوم الأسماك والقشريات بقيمتها الغذائية الجيدة، وبروتيناتها الغنية بالأحماض الأمينية الأساسية والتي تمتاز بسهولة هضمها، وخصوصاً لحوم الأسماك البيضاء المنخفضة في محتواها من الدهون، أما لحوم الأسماك الداكنة والمتميزة بارتفاع نسبة الدهون الجيدة من الناحية التغذوية لاحتوائها على نسبة مرتفعة من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع، كما تحتوى على مجموعة من الفيتامينات والعناصر المعدنية. وفيما يلي التركيب الكيميائي لِلّحوم بعض الأسماك والقشريات:

جدول رقم (22): التركيب الكيميائي لِلّحوم بعض الأسماك والقشريات*

النوع	الماء (الرطوبة)	الكربوهيدرات	البروتينات	الدهون	الرماد
سَمَكُ القُدّ	82.6	0.0	16.5	0.4	1.2
سمك الحَدوق	80.7	0.0	18.2	0.1	1.4
سمك الهلبوت	75.4	0.0	18.6	5.2	1.0
سمك الرَّنْجة	67.2	0.0	18.3	12.5	2.7
الإسْقُمْرِيّ (الماكريل)	68.1	0.0	18.7	12.0	1.2
سمك سليمان (السَّلْمون)	63.4	0.0	17.4	16.5	1.0
سمك أبو سيف	75.8	0.0	19.2	4.0	1.3
السَلْطعون (السَرَطان)	80.0	0.6	16.1	1.6	1.7
جراد البحر (الكَرْكَنْد)	79.2	0.5	16.2	1.9	2.2
البَطْلِينوس (رخويات)	80.3	3.4	12.8	1.4	2.1
المَحار (من الرخويات)	80.6	5.6	9.8	2.1	2.0
المَحار المرْوحِيّ	80.3	3.4	14.8	0.1	1.4

* المصدر (Jay *et al.*, 2005).

والأسماك من أكثر الأغذية قابلية للفساد، فكما في اللحوم تتعرض الأسماك أيضاً إلى تغيرات فيزيائية وكيميائية منذ لحظة صيدها ومغادرتها لبيئتها الطبيعية (الماء).

التغيرات التي تحدث في الأسماك منذُ صيدها:

تتعرض الأسماك لمجموعة من التغيرات التي تحدث لها منذُ صيدها. فإضافة إلى نشاط الأحياء المجهرية الملوثة للأسماك، تتدهور جودة الأسماك أيضاً بعوامل داخلية من أهمها عملية التحلل الذاتي بالإنزيمات الموجودة طبيعيًّا في لحوم الأسماك، وكذلك عملية الأكسدة التي تحدث للدهون في الأسماك الدهنية مما يجعلها غير مقبولة للاستهلاك. ونجمل هذه التغيرات بالتالي:

1- تغيرات طبيعية تحدث بعد الصيد: تتمثل هذه التغيرات بما يلي:

(أ) إفراز المادة المخاطية: يغطى السطح الخارجي للأسماك (الجلد) بطبقة مخاطية (هلامية) تتركب بشكل أساسي من بروتينات سكرية Glycoproteins تنطلق من الغدد المخاطية الموجودة بالجلد نتيجة عدم ملائمة البيئة المحيطة بهذه الأسماك بعد صيدها، وعلى الرغم من أن انطلاق هذه المادة المخاطية في حد ذاته لا يجعل الأسماك فاسدة او غير صالح للاستهلاك إلا أن هذه الطبقة المخاطية تعتبر وسطاً ملائماً لنمو الأحياء المجهرية المتواجدة على هذه الأسماك مما يُسرّع من فسادها وتلفها، كما أن الأحياء المجهرية الملوثة تكون مغمورة في تلك الطبقة المخاطية وبالتالي فإنها تكون صعبة الإزالة.

(ب) التصلب الرمي Rigor Mortis: سبقت الإشارة إلى ظاهرة التصلب الرمي التي تحدث في اللحوم بعد الذبح نتيجة استنزاف جميع أشكال الطاقة الموجودة في العضلة في صورة ATP أو جلايكوجين مما يؤدي إلى تصلب للعضلات وقصر طولها وبذلك تقل طراوتها وجودتها، وهذه الظاهرة تحدث أيضاً في الأسماك، وفساد الأسماك بالأحياء المجهرية لا يبدا ألا بعد حدوث التصلب الرمي وحدوث خروج السائل الخلوي من خلايا الأسماك، وهذا السائل الخلوي يعتبر بيئة صالحة لنمو الأحياء الدقيقة، وبالتالي فكلما دخلت الأسماك في طور التصلب الرمي أسرع كلما كان فسادها أسرع، ويختلف سرعة دخول الأسماك بعد صيدها في طور التصلب الرمي فالأسماك صغيرة الحجم مثل السردين تدخل في طور التصلب الرمي اسرع من الاسماك الكبيرة، كما أن الأسماك المفلطحة أيضاً تدخل في طور التصلب الرمي أسرع من الأسماك المستديرة، وكذلك الأسماك النشطة مثل الإِسْقُمْرِيّ وتلك التي تبذل مجهود اثناء الصيد فالأسماك المجهدة أكثر سرعة في الفساد من الأسماك غير المجهدة (حيث يحدث التيبس الرمي بسرعة كلما كان السمك مجهداً أثناء صيده).

2- التحلل الذاتي:

بعد خروج الأسماك من بيئتها الطبيعية (عملية الصيد) تقوم الإنزيمات الداخلية بإحداث تغيرات تبدأ في طور التصلب الرمي محدثة تلك التغيرات التي سبق الإشارة إليها، كما تستمر إنزيمات التحليل الذاتي بعملها أيضاً بعد انتهاء طور التصلب الرمي مما يؤدي إلى تسهيل غزو الأحياء المجهرية لأنسجة الأسماك، حيث تتحلل البروتينات مما يؤدي إلى انفصال أنسجة لحم السمك من حول العظام وتصبح رخوة وتكون بيئة صالحة لنمو الأحياء المجهرية التي تؤدى الى

الفساد، وهذه الأنسجة الرخوة المتحللة تعد إحدى مظاهر فساد الأسماك حيث أن الأسماك الطازجة لها قوام متماسك، كما أن انزيمات الهضم الموجودة في الجهاز الهضمي تعمل على هضم أنسجة الجهاز الهضمي فيتحلل ويتغير لونه محدثاً نعومة في الانسجة المحيطة بمنطقة البطن (احتراق البطن Belly burn) مما يعد فساداً ظاهراً لأنسجة الأسماك.

3- التغيرات التي تطرأ على دهون الأسماك (أكسدة الدهون):

الأسماك المحتوية علي نسبة دهن مرتفعة تكون سريعة الفساد بشكل أبرز من تلك المنخفضة في نسبة الدهن بسبب تزنخ الدهون، حيث تحتوى الأسماك الدهنية على نسبة مرتفعة من الأحماض الدهنية عديدة عدم التشبع.

فساد الأسماك بواسطة الأحياء المجهرية:

لا يحدث الفساد الميكروبي للأسماك (كما عرفنا سابقاً) إلا بعد إفراز المادة المخاطية من الغدد المخاطية الموجودة على جلد الأسماك، وكذلك بعد حدوث التصلب الرمي وحدوث خروج السائل الخلوي الذي يعتبر بيئة صالحة لنمو الأحياء الدقيقة من خلايا الأسماك، وتتركز الأحياء المجهرية المتواجدة في الأسماك في ثلاث مناطق رئيسة هي السطح الخارجي (الجلد) والخياشيم والأحشاء الداخلية. وتسهم محتويات الأحشاء الداخلية التي تكون ممتلئة بالمواد البرازية بتلوث السطح الخارجي للأسماك بالأحياء المجهرية، وأي ضغط على جسم السمكة يؤدي إلى خروج كميات من المواد البرازية (تحتوي على أعداد هائلة من الأحياء المجهرية) من فتحة المخرج التي لا تحتوي على عضلات تتحكم في غلقها بصورة جيدة، وفي ظل وجود المادة المخاطية المكونة من البروتينات السكرية التي تشكل بيئة جيدة لتكاثر الأحياء المجهرية يبدأ حدوث التلف الميكروبي والذي يكون أكثر سهولة عند دخول السمكة في طور التصلب الرمي. والجدول التالي يوضح أجناس البكتيريا والخمائر المتواجدة بكثرة في الأسماك والقشريات:

جدول رقم (23): أجناس البكتيريا والخمائر المتواجدة بكثرة في الأسماك والقشريات*

البكتيريا	الاِنْتِشَار	البكتيريا	الاِنْتِشَار	الخمائر	الاِنْتِشَار
Acinetobacter	+	*Flavobacterium*	+	*Candida*	+ +
Aeromonas	+ +	*Lactobacillus*	+	*Cryptococcus*	+ +
Alcaligenes	+	*Listeria*	+	*Debaryomyces*	+
Bacillus	+	*Microbacterium*	+	*Hansenula*	+
Corynebacterium	+	*Photobacterium*	+	*Pichia*	+
Enterobacter	+	*Pseudomonas*	+ +	*Rhodotorula*	+ +
Enterococcus	+	*Shewanella*	+ +	*Sporobolomyces*	+
Escherichia	+	*Vibrio*	+ +	*Trichosporon*	+

*المصدر (Jay *et al.*, 2005)، + = معروف بتواجده، + + = تواجده أكثر تكراراً.

أما فيما يخص الأعفان المتواجدة بكثرة في الأسماك والقشريات فيأتي في مقدمتها جنس *Aureobasidium* وبصورة أقل أجناس *Aspergillus*، *Penicillium*، و*Scopulariopsis*.

وإضافة إلى محتويات الأحشاء الداخلية هناك مصادر متعددة لتلوث الأسماك بالأحياء المجهرية وتتمثل في المياه (التي تعيش فيها تلك الأسماك) وهذه المياه قد يصلها التلوث من مصادر كثيرة مثل مخلفات الصرف الصحي والصناعي أو نتيجة رمى المخلفات المختلفة فيها مما يسهم في زيادة تلوث الأسماك بالأحياء المجهرية، كذلك الشباك وأدوات الصيد المختلفة والصيادون ومراكب الصيد وأرضيات استلام المصيد وعملية التداول التي تتم لهذه الأسماك، فالعناية والحرص في عملية تداول الأسماك ابتداء من مرحلة الصيد والنقل المبرد والطرق الصحية في العرض والتسويق تعد من العوامل المهمة في تأخير فساد الأسماك، فحفظ السمك مبرداً أو تجميده بسرعة يعمل على تقليل عملية الفساد.

<u>طرق حفظ الأسماك ومنتجاتها:</u>

كما سبقت الإشارة إلى طرق حفظ اللحوم ومنتجاتها، يتم حفظ الأسماك ومنتجاتها من الفساد الميكروبي والتغيرات الكيميوحيوية والفيزيائية بكثير من الطرق التي سبق ذكرها في حالة اللحوم مثل استخدام درجات الحرارة المنخفضة بوضع الأسماك في أحواض ماء بارد مغمور بالثلج بعد اصطيادها مباشرة أو قد يتم ذلك بعد فصل رأس الأسماك وإزالة أحشاءها وإتمام عملية الإدماء الكامل ،اجراء بعض المعاملات المبدئية الأخرى كالغسيل والتصنيف...الخ، كما يمكن أن تضاف بعض المواد الكيميائية إلى الثلج المجروش أو ماء البحر المبرد المستخدم لتبريد الأسماك (مثل أحماض السلسليك أو البوريك أو مواد مثل بنزوات الصوديوم، نترات البوتاسيوم، وهيبوكلوريد الصوديوم أو بعض المضادات الحيوية) مما يحسن من جودة حفظ الأسماك المبردة. كما تستخدم درجات الحرارة المنخفضة تحت الصفر المئوي من خلال تجميد الأسماك باستخدام مجمدات مثل مجمدات الرفوف العمودية أو الأفقية أو المجمدات الدوارة التي تستخدم في مراكب الصيد الكبيرة أو من خلال مجمدات الغمر التي تستخدم لتجميد بعض أنواع الأسماك بغمرها في محلول ملحي حيث يتم ذلك في شواطئ البحار، إضافة إلى مجمدات الأنفاق التي تكون بهيئة غرف معزولة لتجميد الأسماك الموضوعة في صواني التجميد أو صناديق خاصة ترص في رفوف أو على عربات بينها فراغات لضمان مرور الهواء البارد بينها وهذا ما يكون في عملية تصنيع الأسماك المجمدة. كما يمكن حفظ الأسماك باستخدام درجات الحرارة المرتفعة من خلال عملية التعليب (كما في حالة أسماك التونة والسَّردين والإِسْقُمْرِيّ) والتي تتم بعد مجموعة من المعاملات الأولية مثل الغسيل والتنظيف وفصل رأس الأسماك وإزالة أحشاءها وإتمام عملية الإدماء الكامل

وتقطيعها إلى الحجم المناسب لعملية التعليب....الخ، أو بواسطة عمليات تجفيف الأسماك إما من خلال التجفيف الطبيعي أو الشمسي التي تجفف فيها الأسماك بتعريضها للشمس والرياح قبل تمليحها (كما يحدث في الطرق التقليدية للتجفيف) إلا أن هذه الطريقة تستغرق فترة زمنية طويلة مع الأسماك كبيرة الحجم ولذلك فهي تستخدم مع الأسماك الصغيرة مثل سمك الأنشوفة أو ما يعرف محلياً بالوزِف. أما في حالة الأسماك الكبيرة فيتم تجفيفها صناعياً بواسطة أفران التجفيف وذلك خلال فترة زمنية أقصر بكثير من حالة التجفيف الطبيعي وبالتالي فإن جودة الأسماك المجففة بهذه الطريقة تكون أفضل. كذلك تحفظ الأسماك بعملية التدخين، وقد يسبق تجفيف الأسماك وتدخينها عملية تمليحها إما بإضافة ملح الطعام أو بغمر الأسماك في محلول شديد الملوحة.

أدلة وعلامات فساد الأسماك:

هناك عدد من الفحوصات التي يمكن استخدامها لتحديد فساد الأسماك مثل الفحوصات الحسية والكيميائية والميكروبيولوجية.

1- الفحوصات الحسية:

يمكن الاستدلال على فساد الأسماك من خلال ملاحظة التغيرات التي تحدث على الأسماك الطازجة مثل رائحتها التي تكون مميزة تشبه رائحة حشيشة البحر وعند فساد هذه الأسماك تتحول إلى رائحتها رائحة متحللة تشبه رائحة الأمينات أو رائحة النشادر، والجدول التالي يوضح خصائص الأسماك الطازجة ومقارنتها بالأسماك الفاسدة.

جدول رقم (24): خصائص الأسماك الطازجة ومقارنتها بالأسماك الفاسدة*

الصفة	الأسماك الطازجة	الأسماك الفاسدة
المظهر	براق.	باهت.
العيون	براقة ومكتملة المظهر.	غائرة.
الخياشيم	حمراء براقة اللون.	ذات لون غامق متسخ.
اللحم	صلد الملمس.	طري ورخو.
البطن	نظيفة وخالية من الروائح الكريهة.	متغيرة اللون ذات رائحة كريهة.
الدم	طازج أحمر اللون ذو قوام طبيعي.	غامق رقيق القوام.
العظام	ملتصقة باللحم أثناء الشطر.	تنفصل عن اللحم بسهولة.
العمود الفقري	لؤلؤي (رمادي اللون).	متغير اللون (وردي).
القشور	متماسكة مع الجلد.	غير متماسكة.

*المصدر (عبود وأخرون، 1991).

2- الفحوصات الكيميائية:

هناك عدد الفحوصات الكيميائية التي تُجرى لتحديد جودة الأسماك ودرجة فسادها منها قياس تركيز الأمين ثُلاثيّ ميثيل Trimethylamines (TMA) المتكون من مركب أكسيد الأمين ثُلاثيّ ميثيل Trimethylamine-N-oxide (TMAO) الذي يتواجد في لحوم الأسماك البحرية لكنه لا يتواجد لحوم أسماك المياه العذبة (الأسماك النهرية)، ولذلك فتقدير تركيز الأمين ثُلاثيّ ميثيل في لحوم الأسماك يعتبر من الطرق الكيميائية الشائعة لتحديد جودة الأسماك البحرية ودرجة فسادها ويتواجد الأمين ثُلاثيّ ميثيل بتراكيز منخفضة في الأسماك البحرية الطازجة (ولا يستخدم كمؤشر في حالة أسماك المياه العذبة) ويجب أن لا تتجاوز نسبته 5 – 10 ملجم/100 جرام من لحوم الأسماك، وقد قُدرت إحدى الدراسات كميات الأمين ثُلاثيّ ميثيل في أسماك القُدّ الطازجة بمعدل يتراوح بين 0,18 – 0,20 ملجم/100 جرام من لحم السمك، وبعد خمس أيام تحت ظروف التبريد ارتفعت لتصل إلى معدل 60 – 80 ملجم/100 جرام من لحم السمك.

إن الارتفاع في تركيز الأمين ثُلاثيّ ميثيل يتزامن مع فساد السمك وظهور روائح الأمينات مثل الكادافيرين Cadaverine و البوتْرِيسين Putrescine وكذلك الهيستامين Histamine ولذلك فيمكن أيضاً قياس مستواها لتحديد جودة الأسماك، كما تشكل تلك المركبات الأمينية مع بقية المركبات الناتجة عن تحلل بروتينات الأسماك مقياس مهم لتحديد جودة الأسماك ودرجة فسادها من خلال قياس تركيز النيتروجين الكلي المتطاير Total Volatile Nitrogen والذي يجب أن لا يتجاوز نسبته في الأسماك ما بين 20 – 30 ملجم/100 جرام من لحوم الأسماك.

3- الفحوصات الميكروبيولوجية:

هناك عدد من الفحوصات الميكروبيولوجية التي تجرى على الأسماك لتحديد جودتها الأسماك. وفي هذا الخصوص نورد ما جاء بخصوص الأسماك والقشريات ومنتجاتهما ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها فيما يتعلق باللحوم إضافة إلى مقدمة المواصفة والتعـــاريف وأحكام القبول والرفض....الخ في الفصل السابق.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (25): الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية

الأسماك والقشريات ومنتجاتهما

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
أسماك طازجة أو مجمدة ومنتجاتهما. وأسماك تؤكل طازجة (بدون معاملة)	Total Bacterial Count	5	3	5×10^{5}	10^{7}
	Salmonella	5	صفر	10	5×10^{2}
	Vibrio parahaemolyticus	5	صفر	10^{2}	-
أسماك مدخنة تشمل الرنجة (الهيرنج) سواء الأنواع التي تطبخ قبل الأكل أو التي تؤكل بدون طهي.	Total Bacterial Count	5	3	10^{5}	10^{6}
	Escherichia coli	5	3	10	5×10^{2}
	Staphylococcus aureus	5	2	10^{3}	10^{4}
	Vibrio parahaemolyticus	5	صفر	10^{2}	-
قشريات مجمدة، روبيان، جراد البحر (لبستر).	Total Bacterial Count	5	2	10^{6}	10^{7}
	Escherichia coli	5	3	10	5×10^{2}
	Vibrio parahaemolyticus	5	1	10^{2}	10^{3}
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
كابوريا لحم مطبوخ مجمد أو مبرد.	Total Bacterial Count	5	2	10^{5}	10^{6}
	Escherichia coli	5	1	10	5×10^{2}
	Staphylococcus aureus	5	صفر	10^{3}	-
	Vibrio parahaemolyticus	5	1	10^{2}	10^{3}
منتجات من الأسماك مع مشتقات مخابز في صورة شرائح أو فطائر أو أصابع.	Total Bacterial Count	5	2	10^{6}	10^{7}
	Escherichia coli	5	2	10	5×10^{2}
	Staphylococcus aureus	5	1	10^{3}	10^{4}
منتجات الروبيان أو القشريات مع مشتقات مخابز.	Total Bacterial Count	5	2	5×10^{5}	10^{7}
	Escherichia coli	5	2	10	5×10^{2}
	Staphylococcus aureus	5	1	10^{3}	10^{4}
	Vibrio parahaemolyticus	5	1	10^{2}	10^{3}
أغذية بحرية مجففة، أسماك أو بروتينات مجففة.	*Clostridium perfringens*	5	1	10^{2}	10^{4}
	Staphylococcus aureus	5	1	10^{2}	10^{4}
	Salmonella	5	صفر	صفر	-

الفصل السابع
ميكروبيولوجيا البيض ومنتجاته
Eggs & Eggs Products Microbiology

يعتبر البيض احد المصادر الأساسية لغذاء الإنسان نظرا لقيمته الغذائية العالية جداً إذا ما قورن بالأغذية الأُخرى من حيث ارتفاع نسب مكوناته من البروتين والمعادن والفيتامينات التي يحتاجها الإنسان، إضافة إلى كونه غداء مستساغ وسهل الهضم. كما يدخل البيض في كثير من الصناعات الغذائية مثل صناعة الحلويات والمعجنات وأغذية الأطفال، والجدول التالي يوضح التركيب الكيميائي لبيضة متوسطة الحجم (58 جرام).

جدول رقم (26): التركيب الكيميائي للبيضة (بيضة متوسطة الحجم 58 جم)*

التحليل التقريبي	البيضة الكاملة (مع القشرة)	البيضة الكاملة (بدون القشرة)	البياض	الصفار
الماء (الرطوبة)	65.6	73.6	87.9	48.7
البروتين	12.1	12.8	10.6	16.6
الدهون الكلية	10.5	11.8	صفر	32.6
الكربوهيدرات	0.9	1	0.9	1.05
الرماد	10.9	0.8	0.6	1.05
المجموع الكلي	% 100	% 100	% 100	% 100

*المصدر (عبود وأخرون، 1991).

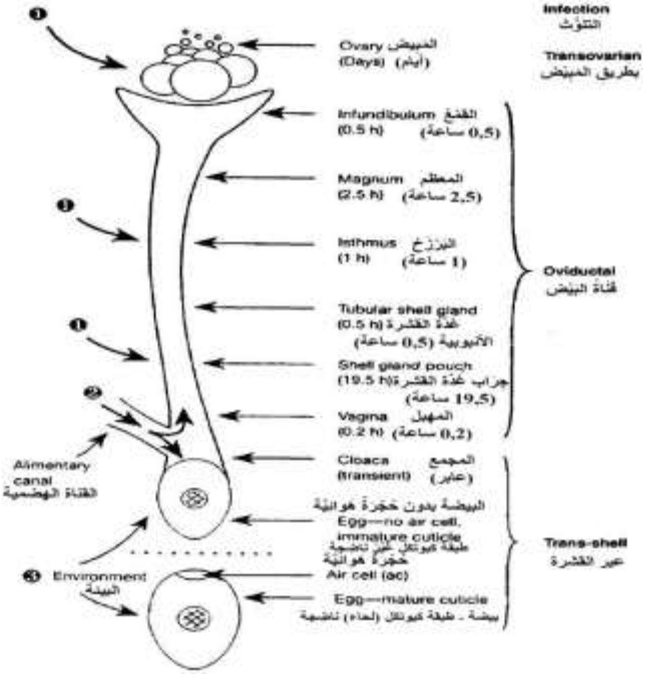
ويعد البيض من الأغذية السريعة التلف وخاصة إذا لم تتخذ الاحتياطيات السريعة اللازمة لمنح ذلك. ومن أهم مسببات التلف الذي يحدث بالبيض هي الظروف الجوية والبيئية المحيطة به من حرارة ورطوبة و تلوث. إن أحسن نوعية وأعلى قيمة غذائية للبيض هي عندما يكون طازجا، ثم تبدأ بعد ذلك التغيرات على مكونات البيضة بمرور الزمن. لذلك كانت فللحفاظ على جودة البيض ومنتجاته يجب منع أي تغيير في مكوناته سواء تلك التي سببها كيميائي أو ميكروبي لتصل إلى المستهلك محتفظة بقيمتها الغذائية والصحية العالية.

تلوث البيض بالأحياء المجهرية:

تتواجد على سطح قشرة البيض أعداد هائلة من البكتيريا والأحياء المجهرية الأُخرى. وعادة فإن أعداد هذه الأحياء تزداد مع مرور الزمن، حيث يلاحظ أن عدد البكتيريا المتواجدة على سطح القشرة للبيضة النظيفة يشكل بضعة الآلف ويرتفع هذا العدد في البيض المتسخ ليصل إلى بضعة مئات آلاف من الخلايا البكتيرية. وعلى العموم فأن عملية تلوث البيض بالأحياء المجهرية تحصل على مرحلتين هما:

1- تلوث البيض قبل الوضع:

إن معظم البيض حديث الوضع يكون خالياً من الأحياء المجهرية من الداخل. ويرجع السبب في ذلك إلى أن قناة البيض تمتلك نظام دفاعي ضد الأحياء المجهرية، ويتمثل هذا النظام الدفاعي بتكوين وإفراز بياض البيض **albumen** الذي يحتوي على عدة أنواع من البروتينات التي لها وظائف حيوية تمنع نمو وتكاثر الأحياء المجهرية. إن عملية إفراز بروتينات البياض (بمنطقة المعظم **Magnum**) سوف تؤدي إلى منع انتقال الأحياء المجهرية من منطقة المجمع **Cloaca** إلى الأقسام العلوية من قناة البيض ولذلك فان تلوث البيض بالأحياء المجهرية التي تسبب التلف والفساد يحدث بعد خروج البيضة من جسم الطائر. ومن الأدلة التي تؤيد هذه النتيجة هي أن البيض النظيف والمخزون بعد الوضع مباشرة بمخازن مبردة لا يتعرض للتلف والفساد بنسبة أعلى من 1 % فقط. أما بالنسبة للأحياء المجهرية المرضية فقد ثبت بأن بعض هذه الأحياء تتمكن من الانتقال إلى البيضة في أثناء فترة وجودها بداخل جسم الطائر المصاب بالمرض ومن أمثلة تلك الأحياء المجهرية الفيروس المسبب لمرض النيوكاسل **Newcastle** والميكوبلازما المسببة لمرض التهاب الجهاز التنفسي ***Mycoplasma gallisepticum***. الشكل التالي يوضح الجدول الزمني لإفراز المكونات الرئيسة لبيض الدجاجِ مع الإشارةِ إلى مواقعِ وأوقات التلوّثِ.



الشكل رقم (156) الجدول الزمني لإفراز المكونات الرئيسة لبيض الدجاجِ مع الإشارةِ إلى مواقعِ وأوقات التلوّثِ، عن (Lund *et al*., 2000).

2- تلوث البيض بعد الوضع:

عند جمع البيض مباشرة بعد وضعه لوحظ أن 2 % من البيض فقط قد تعرض للتلوث الميكروبي حيث يلاحظ وجود أحياء مجهرية على قشرته. إن هذه النتيجة تؤيد الاعتقاد السائد بأنه خلال مرور البيضة في المجمع Cloaca فأنها قد تتعرض للتلوث الميكروبي من خلال الأحياء المجهرية الموجودة مع بقايا الفضلات في هذه المنطقة. إلا أن النسبة الكبيرة من التلوث تحصل بعد عملية الوضع مباشرة لان البيضة في هذه الفترة تكون رطبة كما يسهل عملية نمو وتكاثر الأحياء المجهرية عليها. ويتراوح عدد الأحياء المجهرية التي تم عزلها من قشرة البيضة بين $9,5 \times 10^3$ ولغاية $3,1 \times 10^6$ ويعتمد هذا العدد على عوامل عديدة أهمها ما يلي:

1- درجة نظافة الأعشاش.
2- عدد مرات جمع البيض وسرعة نقله إلى المخازن المبردة.
3- نظام التربية للدجاج البياض.
4- طريقة جمع البيض (آلية أو يدوية).
5- توفر مخازن مؤقتة لخزن البيض في أماكن الإنتاج.

إن مصادر التلوث الميكروبي للبيض متعددة فقد تكون الفضلات والأوساخ الموجودة في منطقة المجمع أو في أماكن التربية وكذلك الأتربة التي تتجمع على البيض أثناء فترة وجوده في الحظائر الإنتاجية ولهذا يلاحظ وجود اختلاف كبير في أصناف الأحياء المجهرية المتواجدة على قشرة البيضة. وبصورة عامة يلاحظ أن اغلب أنواع البكتيريا المتواجدة على قشرة البيضة بأعداد كبيرة جداً تكون تابعة للبكتيريا الموجبة لصبغة جرام. ومن أهم الأنواع التابعة لها *Micrococcus* و *Bacillus* و *Streptococcus* و *Staphylococcus*.

وعلى العموم فأن جميع هذه الأنواع من البكتيريا لا تؤدي إلى فساد البيض ولهذا فإن خطورتها قليلة. أما الأحياء المجهرية التي تؤدي إلى فساد وتلف البيض فهي غالباً ما تكون من الأنواع السالبة لصبغة جرام، ومن أهمها *Pseudomonas* و *Alcaligenes* و *Achromobacter* و *Escherichia* و *Proteus* و *Serratia*.

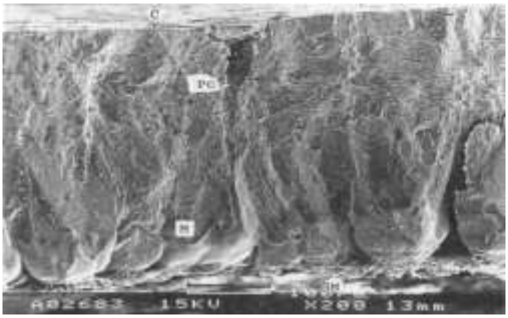
قدرة البيض على مقاومة الأحياء المجهرية:

إن الله سبحانه وتعالى قد أعد البيضة لكي تكون كغذاء وموطن صالح لنمو الجنين الموجود في داخلها (في البيضة الملقحة) ولهذا فأن الله سبحانه وتعالى قد وهب البيضة قدرة على مقاومة الأحياء المجهرية، فقد جهزها بعدة تراكيب وقائية ضد الأحياء المجهرية لأجل أن تمنع وصول أو تغلغل هذه الأحياء إلى منطقة الجنين النامي (على صفار البيض) بداخلها، ومن أهم هذه التراكيب أو الخطوط الدفاعية والتي تلعب دورا هاما في مقاومة البيض ضد الأحياء المجهرية ما يلي:

1- قشرة البيضة Egg shell:

القشرة هي أول الحواجز الدفاعية ضد الأحياء المجهرية، وبذلك تمنع تلوث المحتويات الداخلية بهذه الأحياء المجهرية، وما يؤكد هذا الأمر هو أن اقل من 2 % من البيض النظيف ذو القشرة السليمة يتعرض للتلف خلال فترة الخزن، كذلك يلاحظ ارتفاع نسبة تلوث المحتويات الداخلية للبيضة في البيض المكسور مقارنة مع البيض ذو القشرة السليمة وذلك لسهولة تغلغل الأحياء المجهرية إلى المحتويات الداخلية للبيضة عند وجود أي كسر أو خدش بالقشرة.

وتحتوي قشرة البيض على عدد كبير من المسامات أو الثغور Pores ويتراوح هذا العدد بين 7000 – 17000 ثغر ويبلغ معدل قطر كل ثغر من هذه الثغور حوالي 9 – 35 ميكرون. وتشكل هذه المسامات أو الثغور الممر الرئيسي بين طبقة الكيوتكل (اللحاء) Cuticle وأغشية القشرة، وكما هو ملاحظ بالشكل التالي.



الشكل رقم (157) صورة بالمجهر الالكتروني لقشرة بيضة توضح أحد قنوات المسام الموجودة PC، طبقة الكيوتكل (اللحاء) C، اللب الحلمي M، وأغشية القشرة SM، عن (Lund *et al.*, 2000).

أن الطرف العلوي من هذه المسامات أو الثغور مغطى بطبقة الكيوتكل (اللحاء) Cuticle التي يبلغ سمكها حوالي 10 – 30 ميكرون، وهي مادة بروتينية تفرز على سطح القشرة لسد تلك المسامات أو الثغور. إلا أنها تذوب بالماء كما تتعرض للتشقق بعد أسبوعين من وضع البيضة، وتقوم هذه الطبقة بإعاقة دخول الأحياء المجهرية إلى المحتويات الداخلية للبيضة إلا أن عدداً قليلاً من مسامات القشرة تكون غير مكتملة التغطية بطبقة الكيوتكل فلذلك تشكل هذه المسامات المنفذ الرئيسي لدخول الأحياء المجهرية إلى الداخل علماً بأن عدد هذه المسامات أو الثغور لا يزيد في الغالب عن 10 – 12 ثغر فقط.

إن إزالة طبقة الكيوتكل عن طريق غسل البيضة أو دلكها بمادة خشنة مثل الورق الزجاجي تؤدي إلى رفع نسبة تلوث المحتويات الداخلية بالأحياء المجهرية وكذلك رفع نسبة الرطوبة المفقودة من البيض عند الخزن مقارنة مع البيض الذي لم تتضرر طبقة الكيوتكل فيه بأيٍ من هذه المعاملات، مما يؤكد أهمية الدور الذي تلعبه هذه الطبقة في إعاقة نفوذ الأحياء المجهرية من جهة والمحافظة على نوعية البيض عند الخزن من جهة أُخرى.

وتتكون طبقة الكيوتكل أساساً من البروتين والذي تشكل نسبته حوالي 90 % من الوزن الجاف لهذه الطبقة، وبالتالي فإن الأحياء المجهرية المحللة للبروتين بإمكانها اختراق هذه الطبقة بعد تحليلها. وعند خزن البيض لمدة أربعة أسابيع على درجة حرارة 25°م لوحظ نمو مستعمرات من البكتيريا والأعفان على قشرة البيضة وعند فحص القشرة تحت الميكروسكوب الالكتروني لوحظ وجود مساحات واضحة **Cleared area** حول الخلايا البكتيرية وهذه المساحات الواضحة تمثل المناطق من طبقة الكيوتكل والتي استطاعت البكتيريا تحليلها لتتمكن من الدخول عبر مسامات القشرة إلى المحتويات الداخلية للبيضة.

2- أغشية القشرة Shell membranes:

يوجد في البيضة غشائين للقشرة هما الغشاء الخارجي والغشاء الداخلي للقشرة يقعان بين بياض البيض وقشرة البيضة، وتشكل أغشية القشرة حاجراً ميكانيكياً يمنع دخول الأحياء المجهرية المسببة للتلف إلى داخل البيضة. إن غشائي القشرة يتكونان من طبقات من الألياف البروتينية التي يطلق عليها اسم الألياف الكيراتينية **Keratin fibers** وتشكل هذه الألياف ما يشبه الشبكة التي تعمل أساساً كمرشح لترشيح البكتيريا التي تحاول الدخول إلى داخل محتويات البيضة. وفي إحدى التجارب وضع محلول بكتيري بدلا من صفار البيض وبياضه بحيث يمكن سحب المحلول من هيكل البيضة (قشرة البيضة وأغشيتها) من خلال مسامات القشرة فقط، وقد تم ملاحظة أن المحلول البكتيري الذي سحب من خلال مسامات القشرة وعبر أغشية القشرة كان خالياً من البكتيريا كلياً. ولكن عندما أعيدت التجربة من جديد بعد إزالة أغشية القشرة لوحظ أن المحلول المسحوب من خلال مسامات القشرة كان حاوياً على الخلايا البكتيرية، مما يؤيد أن أغشية القشرة تقوم بترشيح الخلايا البكتيرية وتمنعها من النفاذ إلى داخل محتويات البيض.

إن مقاومة أغشية القشرة لدخول الأحياء المجهرية إلى داخل البيضة تستمر لفترة محددة تمتد من عدة ساعات ولغاية بضعة أيام وبعدها تبدأ هذه المقاومة بالانخفاض التدريجي مع مرور الزمن إلى أن تنعدم نهائياً وبذلك سوف تتمكن الأحياء المجهرية من الدخول إلى المحتويات الداخلية للبيضة بسهولة. أما عن كيفية اختراق الأحياء المجهرية لأغشية القشرة فقد ظهرت نظريتان لتفسير ميكانيكية دخول البكتيريا إلى المحتويات الداخلية للبيضة، فالنظرية الأولى تشير إلى أن هذه العملية تحدث نتيجة لتحلل المادة الكيراتينية المكونة لأغشية القشرة عن طريق إفراز الأحياء المجهرية للإنزيمات المحللة للبروتين. أما النظرية الثانية فهي تشير إلى أن هذه العملية تتم عن طريق قيام البكتيريا بسحب الماء من المادة الكيراتينية لأغشية القشرة وبذلك سوف تتحطم الشبكة الكيراتينية وهذا يسهل عملية دخول الأحياء المجهرية عبر أغشية القشرة.

3- بياض البيض Egg albumen:

يشكل بياض البيض الحاجز الثالث الذي يمنع وصول الأحياء المجهرية إلى منطقة صفار البيض Egg yolk الذي يحتوي على الجنين النامي. ويمتلك هذا الجزء من البيضة نوعين من أنوع المقاومة للأحياء المجهرية هما المقاومة الميكانيكية والمقاومة الكيميائية، وهذان النوعان من المقاومة للأحياء المجهرية يمكن تلخيصهما فيما يلي:

أولاً- المقاومة الميكانيكية Mechanical defense:

إن المقاومة الميكانيكية لبياض البيض تأتي بدرجة رئيسية من خلال خاصية اللزوجة العالية لهذا الجزء من البيضة والذي يشكل ما يشبه الدرع الواقي حول منطقة الصفار، وهذه اللزوجة العالية للبياض سوف تعرقل أو تعطل انتقال الأحياء المجهرية (التي نجحت في النفاذ من كلٍ من قشرة البيضة وأغشية القشرة) إلى منطقة صفار البيض.

ثانياً- المقاومة الكيميائية Chemical defense:

أن الأس الهيدروجيني لبياض البيض والذي يرتفع خلال التخزين من 7,6 (عند الوضع) إلى 9,18 بعد مرور ثلاثة أيام من التخزين على درجة حرارة 3°م يكون غير ملائم لنمو مجموعة كبيرة من الأحياء المجهرية. كما أن بياض البيض من الناحية الكيميائية عبارة عن محلول غروي للعديد من البروتينات التي يشكل Ovalbumin ما نسبته 54,0 % منها، يليه Ovotransferrin ويشكل ما نسبته 12 – 13 %، وOvomucoid 11,0 %، وOvoglobulin G_2 وOvoglobulin G_3 بنسبة 4,0 % لكل منهما، وLysozyme 3,5 %، و Ovoglycoprotein ويشكل ما نسبته 0,5 – 1 %، إضافة إلى بروتينات أخرى مثل Ovaflavoprotein (Riboflavin binding protein) وAvidin وOvomucoid وOvoinhibitor........الخ، وتشكل نسب أقل. وهذه البروتينات الموجودة فيه لها وظائف حيوية هامة جداً في مقاومة الأحياء المجهرية (التي نجحت في النفاذ من كلٍ من قشرة البيضة وأغشية القشرة) ومنعها من الوصول إلى منطقة صفار البيض.

فإنزيم اللايسوزايم Lysozyme وهو أحد بروتينات بياض البيض ذات الفعاليات الحيوية يؤدي دوراً فعالاً في القضاء على الخلايا البكتيرية من النوع الموجب لتصبيغ جرام، حيث يؤثر على طبقة الببتيدوجلايكان المكونة للجدار الخلوي في هذا النوع من البكتيريا، فهذا الإنزيم يقوم بكسر الأواصر الجلايكوسيدية β-1,4 glycosidic bond التي تربط بين الوحدات الأساسية المكونة لهذه الطبقة N-acetylmuramic acid و N-acetylglucosamine.

كما أن بروتين الإفيدين Avidin وبروتين Ovaflavoprotein من البروتينات الهامة التي لها دور في المقاومة الحيوية للأحياء المجهرية أيضاً، حيث تقوم هذه البروتينات بالاتحاد مع الفيتامينات الضرورية للأحياء المجهرية، فيقوم بروتين Avidin بالاتحاد مع البايوتين، أما

بروتين **Ovaflavoprotein** فيتحد مع الريبوفلافين (فيتامين B_2) وبالتالي فإن جعل هذه الفيتامينات بصورة مرتبطة غير حرة سيؤدي إلى عدم تمكين الأحياء المجهرية من الاستفادة من هذه الفيتامينات وبالتالي إضعاف نموها وتكاثرها.

أما بروتين **Ovomucoid** وبروتين **Ovoinhibitor** فدورها في المقاومة الحيوية للأحياء المجهرية يكون عن طريق تثبيطها للإنزيمات المحللة للبروتين التي تفرزها الأحياء المجهرية والتالي تمنعها من الاستفادة من البروتينات كمصادر للنيتروجين والكربون مما يؤدي إلى تثبيط نموها.

ويقوم بروتين **Ovomucoid** بتثبيط فعالية إنزيم التربسين **trypsin** في حين يقوم بروتين **Ovoinhibitor** بتثبيط فعالية إنزيمات التربسين والكيموتربسين **chymotrypsin**، وكذلك إنزيمات البروتينيز التي تفرزه البكتيريا والأعفان **bacterial and fungal proteases**، ونتيجة لتثبيط هذه الإنزيمات ستتعرقل عملية تغذية هذه الأحياء المجهرية مما يمنع نموها وتكاثرها. إضافةً إلى بروتينات **Ovomacroglobulin** و **Ovalbumin** ومركب **Cystatin** التي تشابه في أُسلوب عملها البروتينات السابقة.

أما بروتين **Ovotransferrin** فيكمن دوره في المقاومة الحيوية للأحياء المجهرية بقدرته العالية على احتجاز **Chelation** أيون الحديد وتكوين مركب معقد معه مما يجعله غير متاح لتلك الأحياء المجهرية. وهناك بروتينات أُخرى في بياض البيض مثل **Ovoglobulin G_2** و **Ovoglobulin G_3** و **Ovoglycoprotein** يعتقد بأن لها أدوار في المقاومة الحيوية للأحياء المجهرية إلا أن هذا الأدوار لم يتم التعرف عليها بشكل واضح حتى الأن.

<u>التغيرات التي تسببها الأحياء المجهرية في البيض:</u>

لكي تستطيع أي من الأحياء المجهرية التسبب في فساد البيض يكون قد مر بالخطوات التالية:

1- أن يلوث القشرة.

2- أن يتمكن من النفاذ من القشرة إلى أغشية القشرة عبر المسامات أو الثغور الموجودة فيها والتي ما تكون غالباً مغطاة بطبقة الكيوتكل والتي يمكن إزالتها أما عن طريق غسل البيضة أو دلكها بمادة خشنة أو بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين التي يفرزها الكائن المجهري.

3- أن ينمو على أغشية القشرة وينفذ من خلال هذه الأغشية ليصل إلى بياض البيض.

4- أن ينمو في بياض البيض على الرغم من الظروف غير الملائمة لنمو وتكاثر أغلب الأحياء المجهرية، وبذلك يستطيع أن يصل إلى صفار البيض لينمو هناك ويتكاثر بسهولة.

أما أنواع الفساد الذي تتسبب به الأحياء المجهرية فيمكن تلخيصه فيما يلي:

أولاً - الفساد الأخضر Green rot:

هذا التغير يحدث نتيجة تواجد بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وقد سمي بهذا الاسم نتيجة تلون بياض البيض باللّون الأخضر الناصع خلال المراحل الأولى من هذا الفساد، أما في المراحل الأخيرة فقد يختلط الصفار مع البياض ويغطي على اللون الأخضر، ولا يمكننا الكشف عن هذا النوع من الفساد بالفحص الضوئي في حين يمكن مشاهدته بسهولة عند كسر البيضة. وهذا النوع من الفساد ليس له رائحة أو قد يكون مصحوباً برائحة الفاكهة أو الرائحة الحلوة، ويمكن الكشف عن هذا النوع من الفساد بواسطة تعريض البيضة الفاسدة للأشعة فوق البنفسجية.

ثانياً - الفساد عديم اللّون Colorless rot:

هذا النوع من الفساد في البيض سببه أنواع من جنس *Pseudomonas* أو جنس *Achromobacter* وبعض أنواع بكتيريا القولون. ويمكننا الكشف عن هذا النوع من الفساد بالفحص الضوئي وذلك لأن الصفار هنا سيكون متأثراً بهذا الفساد وخصوصاً في المراحل الأخيرة منه، حيث يضمحل الصفار أو على الأقل تتكون قشور بيضاء فيه، أما الرائحة المصاحبة لهذا النوع من الفساد فتكون أما غير محسوسة أو تكون رائحة الفاكهة أومن رائحة غير مرغوب فيها.

ثالثاً - الفساد الأسود Black rot:

في هذا النوع من الفساد تكون البيضة معتمة عند إجراء الفحص الضوئي وذلك بسبب أن الصفار يكون ذو لون مُسوِد أو ذو لون طيني أو بني. أما بالنسبة للرائحة فتكون عفنة مصاحبة بتواجد غاز كبريتيد الهيدروجين داخل البيضة مما يدل على أن البيضة خزنت في ظروف حرارة عالية. وهناك نوعين من هذا النمط من الفساد هما:

I- النوع الأول يسببه جنس *Aeromonas* مثل *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* وله رائحة البراز ويعطي غاز H_2S وصفار أسود صلب وبياض ذو لون بني مخضر.

II-النوع الثاني تسببه أنواع من جنس *Pseudomonas* والبياض هنا يكون ذو لون أخضر مشع أو بني مخضر، أما الصفار فيكون طرياً مع تواجد الكتل الخضراء المسودة.

رابعا - الفساد الوردي Pink rot:

هذا النوع من التغير اللوني تسببه أنواع من جنس *Pseudomonas*، وهوا إما أن يكون بفعل خزن البيض بدرجات حرارية عالية أو قد يكون في المراحل المتأخرة من الفساد الأخضر إلا أن ذلك غير شائع، وقد يشابه الفساد عديم اللّون ولا يتميز عنه إلا في تواجد بعض البقع الوردية في الصفار والبياض.

خامساً - الفساد الأحمر Red rot:

هذا التغير اللوني غير شائع وتسببه أنواع من جنس *Serratia*، ولا يصحب برائحة مميزة.

سادساً - الفساد الذي تتسبب به الأعفان:

هنالك العديد من الأعفان التي يكن أن تلعب دوراً في فساد البيض. ويلاحظ نمو الأعفان في بداية الأمر قرب الغرفة الهوائية حيث يتوفر الأوكسجين والرطوبة مما يساعد على نموها. وطبقاً لمراحل نمو الأعفان في البيض تعطى المسميات التالية:

I- النمو الأول: وفي هذا النوع تتواجد مستعمرات العفن الصغيرة على سطح القشرة أو تحت القشرة مباشرة. وتختلف ألوان هذه المستعمرات على حسب نوع العفن، فمثلاً جنس *Penicillium* الذي يتواجد تحت القشرة يعطي اللّون الأخضر أو الأزرق، أما جنس *Cladosporium* فيعطي اللّون الأسود أو الأسود المخضر....وهكذا.

II-الفساد الفطري الخارجي: ويحدث هذا النوع من الفساد عند ارتفاع الرطوبة النسبية أثناء تخزين البيض، حيث يظهر نمو العفن على شكل نمو زغبي يغطي القشرة الخارجية. والأجناس المسببة لهذا النوع من الفساد متعددة منها جنس *Penicillium* وجنس *Cladosporium* وجنس *Botrytis* وجنس *Mucor* وجنس *Alternaria*.

III- الفساد الفطري (مرحلة النمو الأخيرة): وفي هذه المرحلة الأخيرة من الفساد تصل الأعفان إلى داخل محتويات البيضة وينتج عن وصولها أن يصبح البياض جلاتينياً وملوناً. ومن الممكن أن يسبب نمو الأعفان تمزق غشاء الصفار.

منتجات البيض Eggs Products:

هناك العديد من منتجات البيض تستخدم في صناعات غذائية مختلفة ومن هذه المنتجات:

1- البيض السائل Liquid eggs ويتم تحضيره تحت ظروف صحية من بيض صحي سليم نظيف منزوع القشرة ومحتفظ بالنسبة الطبيعية لصفار وبياض البيض أما منفردين أو مخفوفين، ومبستر بدرجة كافية لقتل الأحياء المجهرية الممرضة، ويخزن البيض السائل عند درجة حرارة لا تزيد على 5°م لمدة لا تزيد على 5 أيام.

2- البيض المجمد Frozen eggs ويحضر تحت ظروف صحية بتجميد بيض الدجاج السائل، ويخـــزن البيض المجمد على درجة حرارة -18°م لمدة لا تجاوز ستة أشهر.

3- البيض المجفف Dried eggs ويحضر تحت ظروف صحية من المكونات السائلة لبيض صحي سليم ويجفف بإحدى طرق التجفيف المناسبة. وهناك أيضاً البيض المجفد Frozen-dried والذي يتم تحضيره تحت ظروف صحية من المكونات السائلة للبيض بعدها يبستر ثم يجفف بالتجميد العميق. ويخـــزن البيض المجفف والمجفد عند درجة لا تزيد على 10°م لمدة لا تجاوز ستة أشهر.

ويجب أن يعبأ كل من البيض السائل والمجمد والمجفف والمجفد في عبوات مناسبة تحت تفريغ أو في وجود غاز خامل مثل (N_2 أو N_2 و CO_2).

الحدود الميكروبيولوجية للبيض ومنتجاته وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء بخصوص البيض ومنتجاته ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (27): الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية

البيض ومنتجاته

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
بيض سائل مبرد أو مجمد (كامل أو بياض أو مح).	Total Bacterial Count *Coliform* Count *Salmonella*	5 5 5	2 2 صفر	5×10^4 10 صفر	10^6 10^3 -
منتجات البيض المعدة لأغراض خاصة (رضع، كبار السن، أغذية النقاهة، الحساسية).	*Salmonella*	30	صفر	صفر	-
مسحوق البودنج بالبيض.	Total Bacterial Count *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5 10	2 2 1 صفر	10^4 صفر 10 صفر	10^6 10 10^3 -
منتجات غذائية مشتقة من البيض في صورة جافة.	Total Bacterial Count *Salmonella* *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*	5 10 5 5	2 صفر صفر 1	10^4 صفر صفر 10	10^6 - - -
مخاليط الكيك الجافة ذات المحتوى العالي من البيض.	*Salmonella* *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus*	10 5 5	صفر صفر صفر	صفر 10^2 10^3	- - -

الفصل الثامن

ميكروبيولوجيا الخضروات والفواكه

Vegetables & Fruits Microbiology

تعتبر الخضروات والفواكه مصدر للعديد من الفيتامينات والعناصر المعدنية المختلفة، والجدول التالي يوضح التركيب الكيميائي لبعض الخضروات والفواكه.

جدول رقم (28): التركيب الكيميائي لبعض الخضروات والفواكه*

النوع	الماء (الرطوبة)	الكربوهيدرات	البروتينات	الدهون	الرماد
فاصوليا خضراء	89.9	7.7	2.4	0.2	0.8
شَمَنْدَر (بَنْجَر)	87.6	9.6	1.6	0.1	1.1
مَلْفُوف (كُرُنْب)	92.4	5.3	1.4	0.2	0.8
قَرْنَبِيْط (زهرة)	91.7	4.9	2.4	0.2	0.8
خِيار	96.1	2.7	0.7	0.1	0.4
بَصَل	87.5	10.3	1.4	0.2	0.6
بطاطس	77.8	19.1	2.0	0.1	1.0
طماطم	94.1	4.0	1.0	0.3	0.6
تفاح	84.1	14.9	0.3	0.3	0.4
بُرْتُقَال	87.2	11.2	0.9	0.5	0.2
تِين	78.0	19.6	1.4	0.6	0.4
مَوْز	74.8	23.0	1.2	0.8	0.2
مِشمِش	85.4	12.9	1.0	0.6	0.1
عِنَب	81.9	14.9	1.4	0.4	1.4
خَوْخ (دُرَّاق)	86.9	12.0	0.5	0.5	0.1
فَرَاوْلَة	89.9	8.3	0.8	0.5	0.5

* المصدر (Jay *et al.*, 2005).

وعلى الرغم من ارتفاع المحتوى المائي للخضروات والفواكه (كما يتضح من الجدول السابق) الأمر الذي يجعلها عرضة التلف بواسطة الأحياء المجهرية التي تصل إليها خلال مراحل تكوينها على النباتات وبعد حصادها أو قطافها وكذلك أثناء مراحل النقل أو الخزن أو التسويق لهذه الثمار، إلا أن احتواء بعض الخضروات والفواكه على مواد مثل حامض البنزويك في ثمار

التوت البري أو الزيوت العطرية المتواجدة في الثوم والبصل، أو الحموضة المرتفعة في ثمار الفواكه يساعد على حمايتها من التلف بالأحياء المجهرية، إلا أن حدوث سلسلة من التحولات الحيوية في ثمار الخضروات والفواكه بعد حصادها أو قطافها بسبب التنفس والنشاط الإنزيمي يؤدي إلى حدوث تغيرات في تركيبها الكيميائي مثل اختزال الحموضة وتحلل وتطاير بعض المكونات المثبطة للأحياء المجهرية مما يسهم في تلفها وفسادها، لذا فمن الضروري حفظها باستخدام درجات الحرارة المنخفضة لإبطاء التغيرات الحيوية التي فيها وإطالة صلاحيتها.

كما أن التركيب التشريحي لبعض لثمار الخضروات والفواكه المتمثل بوجود أغلفة سيللوزية سميكة يساعد على حمايتها من الإصابة بالأحياء المجهرية المسببة لتلفها، إلا أن تعرض ثمار الخضروات والفواكه إلى رضوض أو خدوش أثناء حصادها أو قطافها يؤدي إلى سهولة تعرضها للتلف بواسطة الأحياء المجهرية، كما أن بعض الثمار قد تحتوي على ثقوب طبيعية على سطحها مما يسهل نفاذ الأحياء المجهرية منها.

ولا تحتوى أسطح الخضروات والفواكه المقطوفة حديثاً فقط على الفلورا **Flora** الطبيعية (التي ذُكرت سابقاً في التلوث بالأحياء المجهرية من النباتات)، وإنما قد تحتوى على أحياء مجهرية أخرى مثل ممرضات النبات البكتيرية مثل ***Erwinia*** و ***Xanthomonas*** وممرضات النبات الفطرية مثل ***Colletotrichum*** و ***Phytophthora*** و ***Sclerotinia***، وكذلك مجموعة من الأعفان الأخرى مثل ***Alternaria*** و ***Aspergillus*** و ***Botrytis*** و ***Geotrichum*** و ***Penicillium*** و ***Rhizopus*** وعدد من الخمائر. وقد لا تتواجد تلك الأحياء المجهرية على الأسطح والأجزاء الخارجية لتلك الخضروات والفواكه بل قد تصل إلى الجزء الداخلي منها كما يحدث في ثمار بعض الفواكه.

وإضافة إلى ذلك قد يحدث تلوث لثمار الخضروات والفواكه بأحياء مجهرية من مصادر أخرى كالتربة ومياه الري وحتى من مياه الصرف الصحي، ففي بلادنا للأسف تستخدم المياه الخارجة من محطات معالجة مياه الصرف الصحي والتي لم ترتقي مخرجاتها إلى مستوى المعالجة المطلوبة (في مناطق بني الحارث بمحافظة صنعاء ووادي المواهب بمحافظة ذمار ووادي ميتم بمحافظة إب وحتى في محطة المعالجة الأولية لمياه المجاري في منطقة البريهي بمحافظة تعز) في ري المحاصيل الزراعية، ومن هذه المحاصيل محاصيل الخضروات مثل المَلْفُوف، البصل، الثوم، الكوسة، البطاطس، الفلفل، الطماطم........الخ، (وقد تؤكل بعض هذه المحاصيل بدون طهي) مما يشكل خطورة تلوث تلك المحاصيل بالأحياء المجهرية المرضية خصوصا التي تصيب الجهاز الهضمي (كما تمت الإشارة إلى ذلك سابقاً). والصور التالية توضح ري وغسيل محاصيل الخضروات بمياه خارجة من محطات معالجة مياه الصرف الصحي.

الشكل رقم (158) ري وغسيل محاصيل الخضروات بمياه خارجة من محطات المعالجة، عن (حيدر، 2005).

كما قد تستخدم الحمأة الناتجة من تلك المحطات لتسميد المحاصيل الزراعية مما يشكل خطر على الصحة العامة عند استهلاك تلك المحاصيل كون الأحياء المجهرية المرضية يمكن أن تبقى حية لفترات قد تمتد من بضعة أيام إلى عدة أشهر، والجدول التالي يوضح فترة بقاء الأحياء المجهرية المرضية في التربة وعلى أوراق المحاصيل عند درجات حرارة 20 – 30°م.

جدول رقم (29): فترة بقاء الأحياء المجهرية المرضية في التربة وعلى أوراق المحاصيل*

الأحياء المجهرية المرضية	فترة البقاء	
	في التربة	على الأوراق
الفيروسات المعوية **Enteroviruses**	< 110 يوم ولكن غالباً > 20 يوم	< 60 يوم ولكن غالباً > 15 يوم
بكتيريا القولون البرازية **Faecal coliform**	< 70 يوم ولكن غالباً > 20 يوم	< 30 يوم ولكن غالباً > 15 يوم
السالمونيلا ***Salmonella spp.***	< 70 يوم ولكن غالباً > 20 يوم	< 30 يوم ولكن غالباً > 15 يوم
الكوليرا ***Vibrio cholerae***	< 20 يوم ولكن غالباً > 10 يوم	< 10 يوم ولكن غالباً > 2 يوم
حويصلات **Cyst** المُتَحَوِّلَة الحَالّة للنُسُج ***Entamoeba histolytica***	< 20 يوم ولكن غالباً > 10 يوم	< 10 يوم ولكن غالباً > 2 يوم
بيوض الصفر الخراطيني ***Ascaris lumbricoides* eggs**	عدة أشهر	< 60 يوم ولكن غالباً > 30 يوم
يرقات الأَنْكِيلُوسْتُوما **Hookworm larvae**	< 90 يوم ولكن غالباً > 30 يوم	< 30 يوم ولكن غالباً > 10 يوم
بيوض الدُّوْدَةُ الشَّرِيطِيَّة البقرية ***Taenia saginata* eggs**	عدة أشهر	< 60 يوم ولكن غالباً > 30 يوم
بيوض الديدان الشَّعْرِينَة ***Trichinella spp.* eggs**	عدة أشهر	< 60 يوم ولكن غالباً > 30 يوم

* المصدر (حيدر، 2005).

فساد الخضروات والفواكه:

ويمكن تلخيص أهم مظاهر فساد الخضروات والفواكه بواسطة الأحياء المجهرية (بكتيريا، أعفان وخمائر) من خلال ما يلي:

1 - التقرح (التبقع) البكتيري Bacterial canker للخضروات والفواكه ومن أهم مسبباته بكتيريا *Corynebacterium michiganense* التي تتسبب في تبقع أو تحلل للفواكه، كذلك بكتيريا *Xanthomonas vesicatoria* التي تتسبب في حدوث بقع سوداء مستديرة على الفواكه مع حدود منقعة مائية أحياناً، كما تتسبب بكتيريا *Pseudomonas syringae* في حدوث بقع متعددة بنية غامقة على الفواكه والطماطم مما يؤثر على مظهرها.

2 - الفساد البكتيري الرخو Bacterial soft rot ويكون على هيئة مظهر مائي رخو مع روائح كريهة خاصة في الخضروات ويتسبب في حدوثه بكتيريا *Erwinia carotovora*، وبعض أنواع جنس *Pseudomonas* وقد يتسبب بعض أنواع جنسي *Bacillus* و *Clostridium* بإحداث هذا النوع من الفساد بدرجة أقل. وتتميز هذه البكتيريا بكونها محللة للبكتين حيث تقوم بتحليل المواد البكتينية من خلال إفرازها لإنزيمات البكتينيز Pectinase التي تعمل على تطرية الأنسجة النباتية مما يفقدها صلابتها وينتج عن ذلك ظهور أجزاء لينة ذات قوام طري بالثمار مع تطور للروائح الكريهة.

3 - اللزوجة والحموضة Slimness and Souring فاللزوجة تحدث نتيجة نمو بعض أنواع البكتيريا المكونة للكبسولة، ومن الأجناس البكتيرية المكونة للزوجة في الخضروات والفواكه بكتيريا القولون وجنس *Pseudomonas*. أما الحموضة فتحدث نتيجة تلوث الخضروات والفواكه بواسطة البكتيريا المنتجة لحامض اللاكتيك مثل أجناس *Lactobacillus* و *Leuconostoc* و *Pediococcus*.

4 - الفساد الحلقي Ring rot هذا النوع من الفساد يحدث في البطاطا ويتسبب في حدوثه بكتيريا *Corynebacterium sepedonicum*، حيث تصبح الحلقة الوعائية للبطاطا عند اجتياح البكتيريا لها صفراء قشدية أو بنية فاتحة سهلة التفتت أو شبيهة بالجبن وبدون رائحة وهي تشبه في مظهرها الفساد الناتج عن اصابة البطاطا بالفساد الحلقي الناتج عن عفن *Fusarium* لكن يمكن تميزها مجهرياً أو من خلال زراعة البكتيريا.

5 - فساد العفن الرمادي Gray mold rot ويكون هذا الفساد على هيئة تبقع رمادي على الخضروات والفواكه يتسبب في حدوثه بشكل رئيس عفن *Botrytis cinerea*.

6 - الفساد الرايزوبسي الرخو Rhizopus soft rot ويكون على هيئة نمو قطني مع نقاط سوداء مع ليونة للخضروات والفواكه ويتسبب في حدوثه عفن *Rhizopus nigricans*.

7 - فساد عفن الالتيرناريا **Atlernaria rot** تتلوث الخضروات والفواكه بهذا العفن قبل مراحلة الحصادِ من خلال الإصابات أو الشقوق والنُدَب التي تحدث في الجذرِ أو الساق أو الزهرة أو الأوراقِ ومن أهم أنواعه *A. alternate*، *A. dauci*، *A. porn*، *A. radicina*، وفي هذا النوع من الفساد تتلون المناطق المصابة بلون بني مائل للخضرة عند بدء نمو العفن ثم تتحول إلى بقع بنية أو سوداء.

8 - الفساد المائي الرخو **Watery soft rot** ويكون مظهره مائي رخو خاصة في الخضروات ويتسبب في حدوثه عفن *Sclerotinia sclerotiorum*.

9 - فساد العفن الأزرق **Blue mold rot** يتسبب في حدوث هذا النوع من الفساد جنس *Penicillium*، ومن أنواعه الشائع *P. italicum* و *P. diagitatum* ويعزى لون الفساد إلى لون جراثيم العفن الخضراء المائلة للزرقة.

10 - فساد العفن الأخضر **Green mold rot** ويتسبب في أجناس *Cladosporium* و *Trichoderma*.

11 - فساد العفن البني **Brown rot** ويتسبب في حدوثه بعض الأنواع التابعة لجنس *Sclerotinia*.

12 - فساد العفن الأسود **Black mold rot** ويتسبب في حدوثه *Aspergillus niger*.

13 - فساد العفن الوردي **Pink mold rot** ويتسبب في حدوثه *Tichothecium roseus*.

14 - الفساد الناتج عن ممرضات النبات الفطرية مثل مرض الانثراكنوز **Anthracnose** الذي يتسبب في حدوثه *Colletotrichum lindemuthianium*، ومرض البياض الدقيقي (الزغبي) **Downy rot** الذي يتسبب في حدوثه جنسي *Phytophthera* و *Bremia*. وفساد نهاية الساق **Stem-end rot** الذي يحدث بشكل خاص في الفواكه ويتسبب في حدوثه أجناس *Diplodia, Fusarium,* و *Phomopsis*.

15 - التخمر كحولي **Alcoholic Fermentation** الذي يحدث في الفواكه بشكل خاص بسبب محموعة متنوعة من الخمائر، التي من أهمها: *Pichia, Rhodotorula, Candida, Hanseniospora, Torulopsis*، لكن هذا النوع من الفساد أو التلف لا يحدث إلا بعد تهتك جدران الخلايا النباتية نتيجة تلف ميكانيكي أو اصابة حشرية أو أي نوع من أنواع التلف الميكروبي الذي يؤدي إلى تهتك جدران الخضروات والفواكه مما يؤدي إلى نمو الخمائر داخلها محدثةً تخمراً كحولياً أو أكسدة وتكوين أحماض عضوية.

حفظ الخضروات والفواكه:

يتم حفظ الخضروات والفواكه ومنتجاتها في درجات حرارة منخفضة لإبطاء التغيرات الحيوية التي تحدث فيها وإطالة صلاحيتها نتيجة تأخير وإعاقة نمو الأحياء المجهرية فيها، كما تحفظ بعض ثمار الخضروات والفواكه بعمليات التجفيف أو التجفيد أو تحفظ الخضروات في محاليل ملحية والفواكه في محاليل سكرية أو من خلال المعاملات الحرارية والتعليب.

وهناك سلسلة من المعاملات الأولية التي تسبق عمليات الحفظ تلك وتتلخص بالتالي:

1 - انتخاب الأصناف الجيدة والصالحة لمعاملات الحفظ المختلفة: حيث يكون فيها اللون والطعم والرائحة ودرجة النضج مناسبة، كما تخلو من الإصابات الحشرية والميكانيكية التي يمكن أن تكون تعرضت لها خلال عمليات الحصاد.

2 - النقع والغسيل: حيث يتم نقع الخضروات والفواكه المعدة للتصنيع والحفظ في ماء مضاف إليه مواد مطهرة مثل الكلور بنسبة 15 - 20 جزء في المليون، بعدها يتم غسلها بواسطة التقليب أو الرش برذاذ من الماء تحت ضغط معين على مسافة معينة.

3 - الفرز: ويتم استبعاد الثمار غير الصالحة للتعبئة أو غير تامة النضج أو المصابة بالحشرات أو الفطريات حال مرورها على سيور ناقلة حيث يقوم العمال باستبعاد غير المرغوب يدوياً.

4 - التقشير Peeling: هناك عدد من الخضروات والفواكه تحتاج إلى إزالة قشرة الثمرة قبل اجراء معاملات التصنيع الأخرى ويتم ذلك من خلال التقشير بالسكاكين (بواسطة أما عمال مدربون أو من خلال ماكينات خاصة)، أو بالتقشير الميكانيكي بالاحتكاك (باستخدام مادة خشنة مثل الورق المفحم Carborundum فتزال القشرة نتيجة احتكاك الثمار بها أثناء الدوران والتقليب) أو التقشير باللهب (كما يحدث في حالة الثوم والبصل) أو التقشير بالبخار المضغوط أو الماء الساخن أو أي من طرق التقشير الأخرى المناسبة.

5 - السلق Blanching: بالماء الساخن أو بخار الماء قبل التعبئة ومن فوائد هذه العملية إيقاف عمل الإنزيمات التي تؤثر على جودة المادة الغذائية (وذلك مع الخضروات أما في حالة الفواكه فتستخدم عملية الكبرتة)، وكذلك إزالة معظم أو كل المواد المخاطية التي قد تتواجد في بعض الخضروات كالباميا مثلاً، وتليين أنسجة الخضروات الورقية وبذلك يمكن تعبئة أكبر كمية ممكنة منها، إضافة إلى اختزال أعداد الأحياء المجهرية.

6 - الكبرتة Sulfuring: حيث تعرض الفواكه وبعض الخضروات لأبخرة ثاني أكسيد الكبريت الناتجة من حرق الكبريت أو بغمرها في محاليل أملاح الكبريت، وهذه العملية تكون بديلة لعملية السلق للفواكه والخضروات التي لا يمكن إجراء عملية سلق لها حيث تودي إلى إيقاف عمل الإنزيمات التي تؤثر على جودتها.

وبعد إجراء هذه المعاملات الأولية يمكن حفظ الخضروات والفواكه من خلال الوسائل التالية:

1 - الحفظ بالتبريد: حيث يؤدي انخفاض درجة الحرارة إلى إبطاء نشاط الأحياء المجهرية وكذلك إبطاء معدل سرعة التفاعلات الكيميائية الحيوية الأخرى مثل تلك التي تحدث أثناء التنفس. ويراعى أثناء حفظ الخضروات والفواكه أن تكون في عبوات مهواة ولا يجوز تخزينها في عبوات محكمة القفل لأنه ينتج عن عملية التنفس غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 وطاقة حرارية نتيجة هدم السكريات، ويشترط لنجاح عملية حفظ الأغذية بالتبريد أن تكون سليمة غير مخدوشة أو مهشمة، بالإضافة إلى استعمال درجة حرارة تناسب طبيعة الغذاء ولا تسبب حدوث أي أضرار به وملاءمة الرطوبة النسبية داخل غرف التبريد بما لا يشجع نمو الأعفان والخمائر عند ارتفاعها، ولا يسبب حدوث ذبول أو جفاف عند انخفاضها، ويتم ضبط الرطوبة النسبية داخل غرف تبريد الخضروات والفواكه عند معدلات 85 – 95 %، كما يتم أحياناً تعديل تركيب جو غرف التخزين المبرد أو التخزين بغاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 بنسبة تتراوح بين 3 – 10 % حيث يؤدي ذلك إلى انخفاض سرعة تنفس المواد الغذائية وبالتالي بطء عملية الهدم في الأنسجة ويساعد ذلك على احتفاظ بعض الفواكه بصفاتها الجيدة طول مدة الحفظ. ومع ذلك تظل طريقة الحفظ بالتبريد من طرق الحفظ القصيرة أو المؤقتة لمدة تتراوح من أيام إلى أسابيع إلى عدة شهور.

2 - الحفظ بالتجميد: وهنا يتم نزع الحرارة الموجودة في الخضروات والفواكه وتخفيض درجة حرارتها إلى أقل من نقطة تجمدها، والتجميد أما أن يكون بطيء **Slow Freezing** أو سريع **Quick Freezing**، وتتميز طريقة التجميد السريع عن التجميد البطيء بصغر حجم البلورات الثلجية المتكونة في حالة التجميد السريع مما يؤدي إلى عدم إحداث تمزق كبير في جدر الخلايا، كما تؤدي طول المدة التي يتم فيها التجميد البطيء إلى زيادة حجم البلورات الثلجية المتكونة مما ينتج عنه تمزق كبير في الأنسجة، وبذلك تفقد الأغذية المجمدة بهذه الطريقة قوامها المتماسك عند الانصهار.

3 - الحفظ بالتجفيف: وهنا يتم خفض نسبة الرطوبة إلى الحد الذي يجعل الخضروات والفواكه غير صالحة لنمو معظم الأحياء المجهرية المسئولة عن فسادها. وعادة تصل نسبة الرطوبة في الخضروات المجففة من 4 - 6 %، بينما تصل في حالة الفواكه من 18 - 24 %، حيث يمكن السماح بارتفاع نسبة الرطوبة في الفواكه لاحتوائها على نسبة عالية نسبياً من المواد الصلبة الذائبة والسكريات. ويمكن أن تتسبب الأحياء المجهرية المحبة للجفاف **Xerophilic** والأحياء المجهرية المحبة للتراكيز العالية من السكر **Osmophilic** في فساد الأغذية المجففة.

4 - حفظ الخضروات في محاليل ملحية ومن خلال عملية التخليل: ويتم ذلك بإضافة ملح الطعام NaCl إليها كملح جاف بنسبة 6 % من وزن الخضروات المملحة يرفع بعدها تركيزه في اليوم الثالث إلى 10 % بإضافة محلول ملحي مركز أو ملح جاف بعدها يرفع تركيز المحلول كل أسبوع بمقدار 2 % حتى يصل إلى التركيز إلى 12,5 % بعد 5 أسابيع من بداية عملية التخليل، بعدها ثم يرفع التركيز بمقدار 1 % كل أسبوع حتى يصل إلى 15 % ملح، كما قد يضاف الملح على شكل محلول ملحي وهنا يتم البدء بمحلول ملحي 2,5 % وتترك الخضروات في المحلول الملحي لمدة 5 أسابيع ثم يتم رفع درجة تركيز الملح بعد ذلك تدريجياً حتى تبلغ 15 %. ولملح الطعام بالنسب المضافة تأثير انتقائي للأحياء المجهرية، فالهدف من التدرج في رفع تركيز ملح الطعام هو إعطاء الفرصة لنمو وتكاثر بكتيريا حامض اللاكتيك في العمل في تركيزات ملحية منخفضة في أول عملية التخليل قبل رفع تركيز الملح إلى حده الأعلى لتعمل على إنتاج حامض اللاكتيك بدرجة جيدة مما يؤدي إلى حدوث تخمر لاكتيكي للمواد الكربوهيدراتية مما يجمع بين التأثير الحافظ للملح وحامض اللاكتيك. وقد تتسبب الميكودرما Mycoderma وهي عبارة عن خمائر غشائية وقد تكون مختلطة ببعض أنواع البكتيريا تتكون فوق المحاليل الملحية في صورة غشاء أبيض أو رمادي، حيث تسبب في تحلل الخضروات ومن ثم فساد الخضروات المخللة، وعليه يجب إزالة طبقة الميكودرما بمجرد تكونها، كما ينبغي عزل الهواء عن المخللات بإضافة طبقة من الزيت فوق سطح الخضروات المخللة. كما قد تحدث أنواع أخرى من الفساد والتلف في الخضروات المخللة مثل ظاهرة المخللات طافية Floated pickles الناتجة عن تواجد خمائر مثل *Torulopsis caroliniana* داخل أنسجة المخللات تعمل على حدوث تخمر شديد وتتكون كميات من الغاز يصعب تسربها إلى خارج الثمرة بسبب سمك الجدار عندها تطفو هذه المخللات، وقد يؤدي التركيز العالي للملح إلى طفو المخللات لكن ما يطفو بسبب الخمائر تكون منتفخة وتبدو أنسجتها الداخلية كأنها فارغة بسبب وجود الغاز. كما قد تتكون مواد لزجة على الخضروات المخللة بسبب النمو بكتيريا *Lactobacilus plantarum* و *Leuconostoc mesenteroides* بشكل سريع وبأعداد كبيرة جداً خاصة في درجات الحرارة المرتفعة. وقد تسود المخللات نتيجة نمو *Bacillus subtilis* var. *nigrificans* في المخللات وتكوينها كبريتيد الهيدروجين H_2S، الذي يتفاعل مع الحديد ليكون راسباً أسود هو كبريتيد الحديدوز FeS. وقد تتهتك أنسجة المخللات نتيجة نمو بعض الأحياء المجهرية المحللة للبكتين من خلال افرازها لإنزيم البكتيناز Pectinases، الذي يهتك أنسجة الخضروات المخللة.

5 ـ حفظ الفواكه بإضافة السكر: من خلال رفع نسبة السكر ورفع الجوامد الصلبة عموماً، مما يؤدي إلى خفض نسبة الرطوبة إلى الحد الذي تصبح معه الرطوبة المتبقية مرتبطة بالمواد الصلبة، فلا تستطيع الأحياء المجهرية أن تستفيد بها في نشاطها. وبإضافة السكر إلى الفواكه يمكن أيضاً تصنيع أنواع جديدة من منتجات الفواكه مثل المربيات والهلام (الجيلي) والمرملاد وذلك من لب الفاكهة والسكر مع إضافة كل من حامض الستريك والبكتين الموجودان في لب الفاكهة (على حسب نوع الفاكهة ودرجة نضجها) أو المضافان إليه لتكوين الحالة الغروية، وكذلك إضافة شرائح البرتقال في حالة المرملاد حيث يجب أن تكون معلقة وموزعه بشكل جيد ومنتظم.

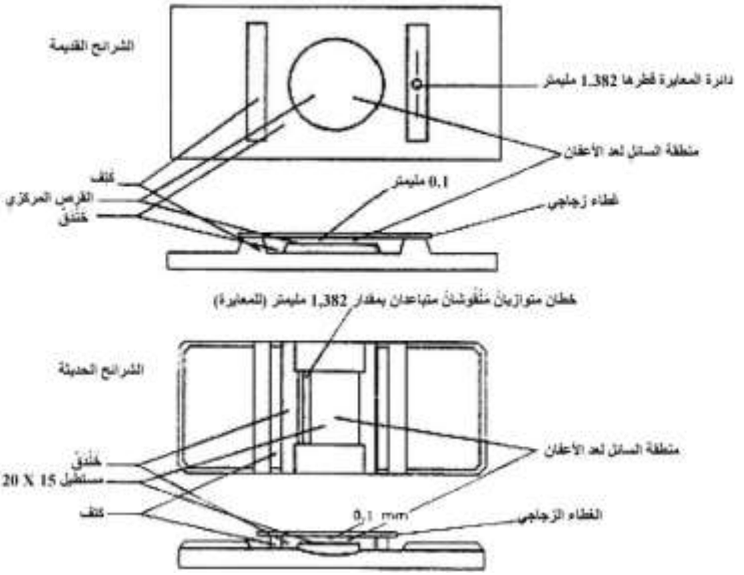
6 ـ الحفظ بالمعاملات الحرارية والتعليب (وهو ما سيتم استعراضه مفصلاً في الفصل التالي).

منتجات الطماطم وتلوثها بالأحياء المجهرية:

تعد منتجات الطماطم من أكثر منتجات الخضروات والفواكه المصنعة انتشاراً. وعند تصنيع هذه المنتجات يتم اختيار ثمار الطماطم السليمة تامة النضج والاحمرار واستبعاد الأعناق الخضراء والأجزاء المصابة بالفطريات ويتم غسلها عن طريق نقعها في الماء عدة مرات مع تقليبها للتأكد من نظافتها. يتم هرس الثمار جيدا بالضرب في الخلاط مع التسخين لاستخلاص أكبر قدر من العصير ثم يصفى الناتج لاستبعاد القشور والبذور. ومن أمثلة هذه المنتجات لب الطماطم Tomato puree ويقصد به العصير الناتج من ثمار الطماطم الطازجة والذي يتم تركيزه (تحت التفريغ) بحيث تصبح نسبة المواد الصلبة الكلية من لب الطماطم تتراوح ما بين 13 - 25 % بالوزن وقد تضاف أو لا تضاف نسبة لا تزيد عن 2 % بالوزن من ملح الطعام، يتم تعقيم الناتج وحفظه في عبوات معدنية أو زجاجية أو أكياس مرنة أو شبه صلبة ولا يضاف له أي مواد ملونه أو حافظة. وهناك أيضاً معجون الطماطم المركز Tomato paste المنتج من عصير الطماطم المصفى بعد تركيزه، بحيث تتراوح نسبة المواد الصلبة به من الطماطم ما بين 25 - 33 % والذي ينتج منه صلصة الطماطم وكذلك هناك منتجات أخرى من الطماطم مثل عجينة الطماطم والصلصة الحريفة (الكاتشب Ketchup) وعصير الطماطم وغيرها.

وتنص المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) أن تجتاز منتجات صلصة طماطم الحارة (الكاتشب) ـ صلصة طماطم متبلة ـ عجينة الطماطم، عصير الطماطم ـ الشطة الحارة، اختبار كفاءة التعقيم التجاري بالتحضين من 25 ـ 35 °م لمدة عشرة أيام بحيث يجب ألا توجد أي علامات تدل على النمو الميكروبي والانتفاخات أو عيوب قفل في العبوات أثناء التحضين.

ولضمان جودة منتجات الطماطم المختلفة من الناحية الميكروبية ينبغي فحص العصير المصفى المستخلص المعد للتصنيع باستخدام بطريقة هوارد **Howard method** لعد الأعفان حيث يتم استخدام شريحة هوارد **Howard mold counting slide**، وهي عبارة عن شريحة زجاجية مجهرية حاوية على دائرة مسطحة (في وسطها) يبلغ قطرها حوالي 1,9 سم (أو مستطيل 15 × 20 مليمتر في الشرائح الحديثة) محاطة بخندق مطوق من جوانبه بأكتاف ترتفع 0,1 مليمتر عن سطح الشريحة، ويوضع غطاء زجاجي فوق الاكتاف تاركاً عمقاً مقداره 0,1 مليمتر بينة وبين الشريحة، وقد كان للشرائح القديمة دائرة قطرها 1,382 مليمتر للمعايرة، أما الشرائح الحديثة فلها خطان متوازيانُ مَنْقُوشانُ متباعدان بمقدار 1,382 مليمتر يستخدمان للمعايرة وتحديد مساحة الحقل المجهري و حجم المادّةِ في الحقلِ المجهريِ، وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



مساحة الحقل المجهري = $(\frac{1,382}{2})^2 \times 3,1416 = 1,5$ مليمتر^2

حجم المادّةِ في الحقلِ المجهريِ = $1,5 \times 0,1 = 0,15$ مليمتر^3

الشكل رقم (159) شريحة هوارد لعد الأعفان، عن (**Health Protection Branch, 1981**).

وفي هذه الطريقة يرفع الغطاء الزجاجي للشريحة ثم توضع كمية صغيرة من العينة المخلوطة جيداً باستخدام نصل سكين أو مشرط على القرص المركزي ثم تنشر بالتساوي على القرص باستخدام نفس الأداة ثم يوضع الغطاء على الشريحة ليكون التوزيع متماثلاً، توضع شريحة تحت المجهر ويجرى الاختبار بحيث يكون المجهر مضبوطاً ليغطي كل حقل أو رؤية مساحة قدرها 1,5 مليمتر^2 (هذه المساحة يمكن الحصول عليها بضبط أنبوبة السحب بالمجهر بحيث يصبح قطر الحقل بمقدار 1,382 مليمتر.

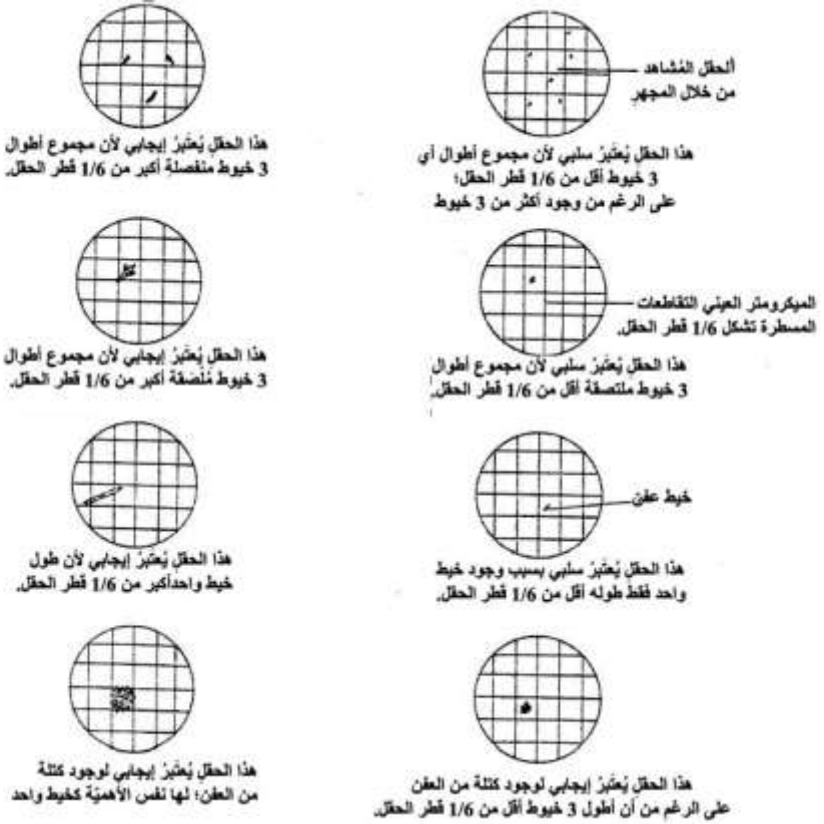
يتم اختيار ما لا يقل عن 25 حقل في كل شريحة من شريحتين أو أكثر محملتين بالعينة على أن تكون هذه الحقول ممثلة لكل أقسام الشريحة المحملة مع استخدام قوة تكبير من 90 إلى 125، وفي حالة صعوبة تمييز خيوط الفطر بوضوح في الحقل القياسي، يتم استخدام قوة تكبير حوالي 200 حتى يمكن تأكيد التعرف على خيوط الفطر السابق مشاهدتها في الحقل القياسي، يلاحظ وجود خيوط الفطر أو عدم وجودها بعد مشاهدة كل حقل ثم تسجل النتائج موجبة عندما يكون الطول الإجمالي لثلاثة خيوط موجودة يزيد على $\frac{1}{6}$ قطر الحقل.

فهذه الطريقة تعتمد على تقدير النسبة المئوية للحقول المجهرية الموجبة التي تحتوي على خيوط العفن، ويتم حساب النسبة المئوية للحقول الموجبة من خلال المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للحقول الموجبة} = \frac{\text{م}}{\text{ي}} \times 100$$

حيث م = عدد الحقول الموجبة التي تم مشاهدتها، ي = عدد كل الحقول المختبرة

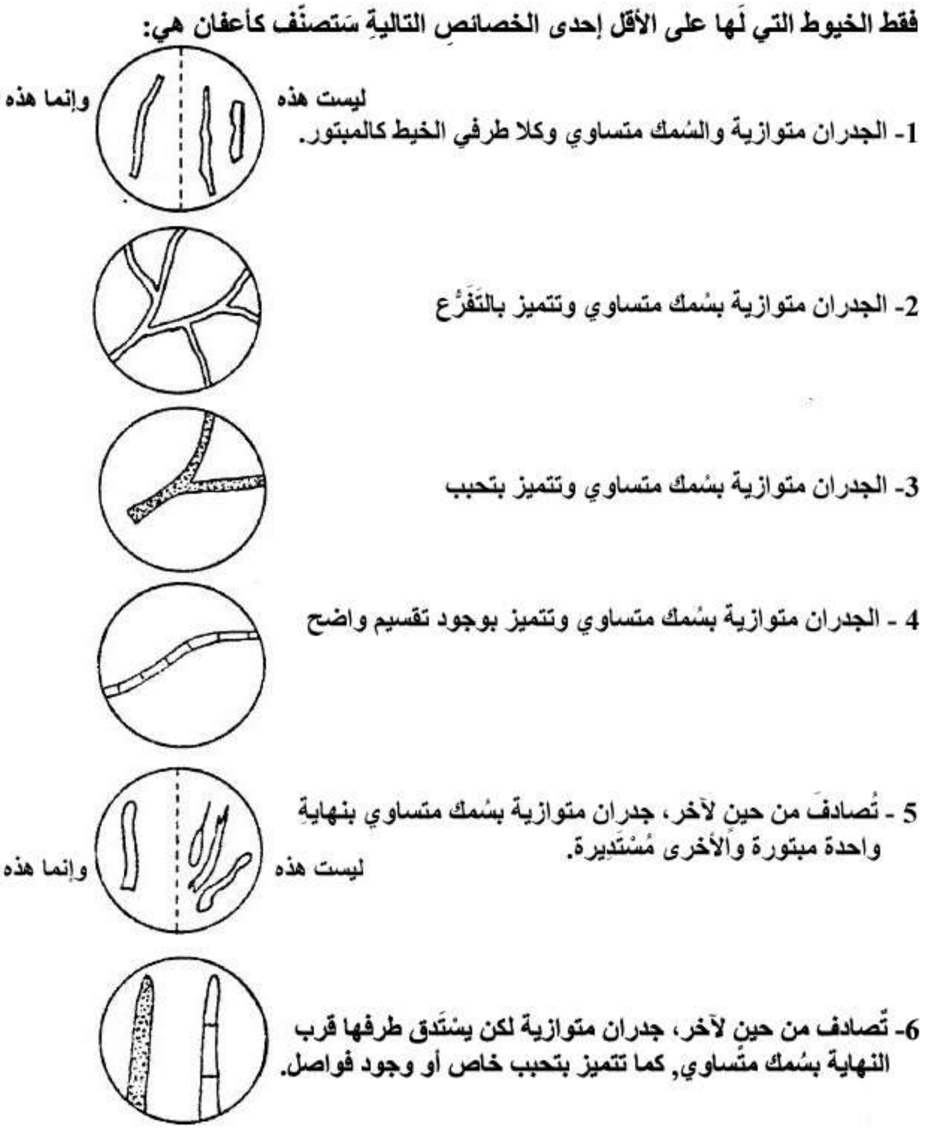
وفيما يلي توضيح لكيفية تصنيف الحقول المجهرية المشاهدة في شريحة هوارد كحقول إيجابية أو سلبية.



الشكل رقم (160) يوضح كيفية تصيف الحقول المجهرية في شريحة هوارد كحقول إيجابية أو سلبية، عن (Health Protection Branch, 1981).

وتنص المواصفات على أن لا تزيد عدد الحقول الموجبة في العينة عن 20 %، وتطبق هذه الطريقة على عدد من منتجات الخضروات والفواكه المصنعة وهي مفيدة في حالة عدم وجود كميات كبيرة من الأنسجة تحجب رؤية الفطر كما هو الحال في عصير الطماطم أو منتجات الخضروات والفواكه المصنعة والمشروبات الخفيفة.

وفي هذا الطريقة ينبغي على الفاحص أن يتمكن من التمييز بين هيفات الأعفان والأنسجة النباتية حيث يصعب التمييز بينهما، والشكل التالي يوضح الصفات التي تتميز بها هيفات الأعفان:



الشكل رقم (161) تـــوضيح للـــصفات التي تتميز بها هيفات الأعـــــفان عن الأنسجة النباتية، عن (Health Protection Branch, 1981).

مرطبات الفواكه وتلوثها بالأحياء المجهرية:

يستخدم لب الفاكهة Fruit pulp (الطازج أو المركز أو المجمد أو المجفف أو المجفد أو المعلب) في صناعة مرطبات الفواكه Fruit beverage والتي قد يطلق عليها البعض اسم عصائر الفاكهة Fruit juices، ولكن هذا الوصف غير دقيق فما قد ينتج من لب الفاكهة خصوصاً على النحو التجاري (كما هو متواجد في الأسواق المختلفة) ليست عصائر فاكهة خالصة وإنما مشروبات تحتوي على نسب من عصير أو لب الفاكهة بنسب تتراوح بين 6 % إلى 38 % يضاف إليها الماء والسكر وقد يضاف إليها غالباً بعض مواد النكهة ومواد ملونة ومواد مثخنة للقوام، وهذه المنتجات يطلق عليها اسماء النكتار (الرحيق) nectar وشراب الفاكهة fruit drink، على حسب تركيز لب الفاكهة المتواجد فيها، ولذلك يمكن تسميتها عموماً بمرطبات الفاكهة fruit beverage. كما قد ينتج شراب الفاكهة الصناعي والذي تستخدم فيه مواد تشبه طعم ورائحة ونكهة ولون عصير الفاكهة الطبيعي، وزيادة في تقليد الشراب الصناعي للشراب الطبيعي تضاف أحياناً مواد معكرة Clouding materials قد تكون مأخوذة من لب الفاكهة بحيث تظل عالقة بالشراب ولا ترسب.

وتنتج أنواع عديدة من مرطبات الفواكه مثل تلك الرائقة، التي لا تحتوي على أنسجة أو قطع من الثمار نفسها، وتستخدم أنزيمات لترويقها، أو أخرى غير رائقة تحتوي على قطع وأنسجة من الثمار. ونتيجة للأس الهيدروجيني المنخفض فيها فإن أهم عوامل فساد وتلف مرطبات الفواكه هي الأعفان والخمائر لذلك قد تضاف مواد حافظة (بعد معاملة هذه المرطبات حرارياً) مثل بنزوات الصوديوم وسوربات البوتاسيوم بتركيز محدد يهدف للسيطرة على نمو الأعفان والخمائر، ويمكن الاستغناء عن تلك المواد الحافظة المضافة في حال ما إذا كانت المعاملة الحرارية كفؤة مع الحرص على العناية بالشئون الصحية لمعامل الإنتاج وتطبيق معايير التصنيع الجيد، كذلك الاهتمام بالجودة الميكروبية للمواد الخام الداخلة في عملية التصنيع.

وللكشف عن جودة مرطبات الفواكه وكذلك لب الفاكهة الخام المستخدم في صناعة مرطبات الفواكه يمكن استخدام الطرق الكيميائية، فكما سبق وأن عرفنا أن هناك عدد الفحوصات الكيميائية التي تُجرى لتحديد جودة الأسماك ودرجة فسادها، وفي حالة الخضروات والفواكه يمكن أيضاً الكشف عن فساد وتحلل منتجاتها من خلال كواشف كيميائية معينة فالعد الميكروبي القياسي Standard Microbial Count لا يعتبر مقياسا جيدا لنشاط الأحياء المجهرية في مرطبات الفاكهة (مثلاً) ومدى جودة تلك المنتجات أو لب الفاكهة الخام المستخدم في الصناعة ولذلك فمن الافضل قياس تلك المركبات التي تنتجها الاحياء المجهرية مثل تقدير نسب مركب الأستيل مثيل كاربينول Acetyl methylcarbinol (AMC)، فمثلاً في مرطبات الفواكه أُقترح أنه إذا كانت

نسبة الأستيل مثيل كاربينول (AMC) بين 0 – 1 جزء بالمليون فهذا يدل على أنه من نوعية جيدة، أما إذا كانت نسبته بين 1,1 – 1,6 جزء بالمليون فهذا يدل على أنه من نوعية مشكوك فيها، وإذا كانت النسبة أعلى من 1,6 جزء بالمليون فتكون نوعيته مرفوضة.

وهناك كواشف كيميائية أخرى مثل ثنائي الأستيل Diacetyl ومركب 2 ، 3 بيوتانديول 2, 3 Butanediol (2, 3 Butylene glycol) وأيضاً الكحول الإثيلي وكذلك الأحماض المتطايرة وغير المتطايرة Volatile and Non-Volatile acids. فمثلاً إن تلف مرطبات الحمضيات يأتي من تكوين مركب Diacetyl بفعل بكتيريا حامض اللاكتيك ويكشف عنه باختبار Voges-Proskaur. وعند اختيار أي كاشف كيميائي لتقدير جودة المواد الغذائية المختلفة ينبغي أن يحقق الشروط التالية:

1 – عدم احتواء الغذاء غير المتحلل على ذلك الكاشف الكيميائي.

2 – أن تزداد نسبة هذا الكاشف مع زيادة نسبة التحلل والفساد.

3 – أن يكون الكاشف ثابت خلال مراحل التخزين.

الحدود الميكروبيولوجية للخضروات والفواكه وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نـورد هنـا مـا جـاء بخصـوص الخضـروات والفواكـه ضـمن المواصـفة القياسـية اليمنيـة والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجـري الاختبـار علـى عينـة واحـدة. وإذا كـان الحـد الميكروبـي ٨٠% مـن الحـد الأقصـى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (30): الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية

الخضروات والفواكه ومنتجاتها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
خضروات طازجة (تستهلك بدون طهي)	*Escherichia coli*	5	2	10	10^2
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
خضروات جافة	*Escherichia coli*	5	2	10^2	10^3
سلطة الخضار	*Escherichia coli*	5	2	10	10^2
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
سلطة كولسلو **coleslaw** (سلطة مكونة من الملفوف والجزر والمايونيز)	Total Bacterial Count	5	1	10^5	10^6
	Staphylococcus aureus	5	1	10^2	10^4
	Escherichia coli	5	2	10	10^2
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
خضروات أو فواكه مجمدة لها رقم هيدروجيني يساوي أو أكثر من 4,5	*Escherichia coli*	5	2	10^2	10^3
خضروات أو فواكه مجمدة لها رقم هيدروجين أقل من 4,5	يقاس الرقم الهيدروجين	يجب أن يكون أقل من 4,5 في كل العينات المختبرة			
صلصة طماطم الحارة (الكتشب) ـ صلصة طماطم متبلة ـ عجينة الطماطم، عصير الطماطم ـ الشطة الحارة	يجب أن تجتاز اختبار كفاءة التعقيم التجاري بالتحضين من 25 - 30°م لمدة عشرة أيام	يجب ألا توجد أي علامات تدل على النمو الميكروبي والانتفاخات أو عيوب قفل في العبوات أثناء التحضين			

تابع جدول رقم (30): الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية

الخضروات والفواكه ومنتجاتها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
فواكه جافة ـ تمر ـ تين ـ مشمش ـ عنب ـ والمنتجات المشابهة	Molds	5	2	10	10^2
	Yeasts	5	2	10^2	10^3
	Escherichia coli	5	2	صفر	10
شراب وعصير فاكهة	Total Bacterial Count	5	2	5×10^3	10^4
	Coliform Count	5	3	5	10^2
	Molds and Yeasts	5	2	10^2	10^3
المربى والجيلي والمرملاد	Molds and Yeasts	5	1	10^3	10^4
فاكهة أو قطع فاكهة في شراب سكري	تحضن العبوات عند 35°م لمدة 10 أيام	- يجب ألا يوجد أي علامة تدل على النمو الميكروبي. - يجب ألا يحدث أي تغير في الصفات الحسية أو الكيميائية بعد التحضين			

الفصل التاسع
ميكروبيولوجيا الأغذية المعلبة
Canned Food Microbiology

تمت الإشارة في بداية هذا الكتاب إلى ما قام به سبالانزاني الذي أشار إلى أن المستخلصات المغلية في أوعية مغلقة لمدة كافية لا تظهر فيها الأحياء الدقيقة ما دامت مغلقة، وقد استفاد الفرنسي نيكولاس أبرت قد من تجربة سبالانزاني في ابتكاره لعملية تعليب الأغذية، فتمكن في عام 1795م من النجاح في حفظ الأغذية لفترات طويلة في عبوات زجاجية مغلقة معاملة بالحرارة حتى درجة الغليان، وسرعان ما استخدمت هذه العملية وطورت في صناعات الأغذية، فحصل بيتر ديوراند عام 1810م على براءة اختراع لصناعة علب معدنية معززة بالقصدير تستخدم في عمليات تعليب الأغذية، (وقد أدى ذلك عام 1900م إلى ظهور العلبة الصحية Sanitary Can المستخدمة حتى وقتنا الحاضر، التي بدأ استعمال الطلاء الداخلي فيها عام 1921م)، كما تمكن شيفاليير أبرت في عام 1851م من اختراع المعقم الموصد، بعدها تمكن شرايفر في عام 1874م من اختراع معقم بخاري مزود بوسائل أمان يتحمل الضغط العالي. وبذلك ظهرت صناعة تعليب الأغذية التي تعتمد على المعاملات الحرارية للغذاء المعلب، ويسبق المعاملة الحرارية عمليات تحضيرية سبق الحديث عنها في الفصل السابق وبالتالي فليس هنالك حاجة لإعادتها هنا. وبعد تلك العمليات التحضيرية والمعاملات الأولية السابق ذكرها التي تهدف إلى تجهيز الأغذية الخام فإن عملية التعليب نفسها تشتمل على خمس عمليات أساسية هي: 1- التعبئة 2- التسخين الابتدائي 3- قفل العلب (القفل المزدوج) 4- المعاملة الحرارية 5- التبريد.

تعتبر عملية تعبئة الغذاء في العبوات من أول العمليات التي تجري في عملية التعليب فبعد عملية السلق قد يجرى إعادة فرز الغذاء غير الصالح للتعبئة، ثم يعبأ بواسطة أجهزة خاصة لملأ العلب بالتساوي، كما قد تتم التعبئة يدوياً، وعموماً تختلف طريقة التعبئة باختلاف الأغذية المختلفة، يليها عملية إضافة المحلول الملحي أو السكري إلى العبوات، ويجب أيضاً عند التعبئة عدم ملء العلبة إلى نهايتها بل يترك فراغ رأسي Head space بارتفاع لا يقل عن $\frac{1}{16}$ من طول العلبة في نهاية العلبة يسمح بتمدد السوائل.

ومن العبوات المستخدمة في صناعة تعليب الأغذية العبوات الزجاجية أو المعدنية أو علب الألمنيوم أو الأكياس المرنة أو شبه صلبة، وتستخدم العبوات الزجاجية في تعليب الخضروات والفواكه ومنتجاتها المختلفة، وتمتاز العبوات الزجاجية بعدم تفاعلها مع المادة الغذائية، وبوضوح ما بداخلها، وبإمكانية إعادة استعمالها، إلا أنها ثقيلة الوزن، وسريعة الكسر، ولذلك فإن

أكثر العبوات استخداماً في تعليب الأغذية المختلفة العبوات المعدنية التي تصنع من صفائح الحديد العالي النقاوة المعززة من الجهتين بطبقة متجانسة السُمك من القصدير وتطلى من الداخل بطلاء أو مينا **Enamel** مصنوع من مواد عضوية ذات صفات خاصة تمنع تفاعل مكونات الغذاء مع معدن العلبة، مثل الطلاء الراتنجي الزيتي ومن أنواعه **Enamel C** الذي يدخل في تركيبه أكسيد الخارصين (الزنك)، ويخصص لطلاء العلب التي تحوي على أغذية فيها كبريت، كما في سائر أنواع اللحوم مع الخضار والبقول حيث يتفاعل الخارصين مع الكبريت مكوناً كبريتيد الخارصين ذو اللون الأبيض المقبول، وطلاء **Enamel R** الذي يستخدم لعلب الأغذية المحتوية على صبغات نباتية كالكرز والمشمش، والطلاء الراتنج الفنيلي مثل طلاء **Enamel L** الذي يستعمل للعلب المخصصة لتعبئة الأغذية الحامضية كالفواكه والمربيات والمخللات ومنتجات الطماطم، وقد يكون الطلاء الداخلي من راتنجات الإيبون ويخصص لمنتجات الألبان. وهناك أيضاً علب الألمنيوم وتمتاز بأنها مقاومة للتآكل إلا أنها أضعف من العلب المعدنية، وأغلى سعراً كما أن حجمها وسعتها محدودان. كذلك هناك الأكياس المرنة القابلة للتعقيم وهذه الأكياس تمتاز برقتها وبسرعة وصول الحرارة إلى مركزها، وبسرعة تعقيمها مما يساعد على حفظ لون الأغذية ونكهتها وجودتها التي قد تتأثر بطول زمن التعقيم في العلب المعدنية أو الزجاجية. كذلك فهناك العبوات شبه الصلبة التي تتألف من طبقات من البلاستيك ورقائق الألمنيوم والورق المقوى وتستخدم كعبوات للحليب طويل الأجل ومرطبات الفاكهة وغيرها.

تصنع العلب المعدنية من صفائح الصلب **Steel** التي كان يتم تغطيسها في مادة القصدير الذائب. وقد تم استبدال طريقة التغطيس الساخن تدريجياً بطريقة التغليف الكهربائي للقصدير بصفائح الصلب. وقد سمحت هذه الطريقة باستعمال أوزان أقل وأكثر تجانساً من القصدير والحصول على سماكات مختلفة على كل جهة من ألواح الصلب. وعند وصول صفائح الصلب **Steel** المعززة من الجهتين بطبقة من القصدير والمطلية من الداخل بطلاء مصنوع من مواد عضوية ذات صفات خاصة تمنع تفاعل مكونات الغذاء مع معدن العلبة إلى مصنع الصفيح يتم تشكيل وبناء العلبة من خلال العمليات التالية:

أ- تقطيع الواح صفائح الصلب السابق ذكرها ألياً إلى الحجم المناسب بحيث يكون فيها الطول مساوي لمحيط العلبة والعرض مساوٍ لارتفاع العلبة.

ب- تقطيع زوايا الواح الصفائح بطريقة تسمح باللحام الجانبي الجيد عند تكوين هيكل العلبة.

ج- ثني الحواف الطولية الجانبية وتكوين الهيكل الأسطواني للعلبة من خلال ألة تقوم بلف الألواح بحيث تتداخل الحواف المثنية مع بعضها. ثم ضغط الحواف الطولية الجانبية للتهيئة لعمل اللحام الجانبي.

د- عمل الشفة العليا والسفلى، وهما حافة جسم العلبة الاسطواني والذي يكون مثنياً إلى الخارج مؤدياً إلى تكوين حافة ناتئة إلى الخارج. وهذه الشفة تصبح الجزء المعكوف من الجسم والتي تتداخل مع خطاف الغطاء أثناء الغلق المزدوج.

ه- صناعة أغطية العلبة، وبعد تشكيل هذه الأغطية من الواح صفائح الصلب السابق ذكرها بواسطة ألة تشكيل خاصة من خلال الضغط الشديد على هذه الألواح وتكوين الهيكل المرغوب المزود بحلقات دائرية تعرف بحلقات التمدد التي تساعد على مقاومة الضغط الناشئ عن تمدد المواد الغذائية المعبأة أثناء التعقيم.

و- وضع مركب التبطين في الأخدود الداخلي لغطاء العلبة، ومركب التبطين هو مادة مالئة توضع لإحكام الغلق ومنع التسرب.

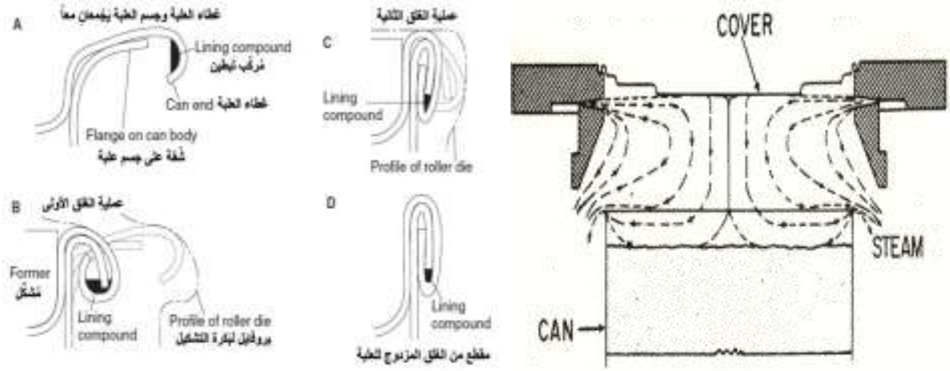
ز- غلق العلبة من الناحية السفلية تمهيداً لعمليات التعبئة اللاحقة من ثم القفل المزدوج **Double Seaming** للعلب تمهيداً لإجراء المعاملات الحرارية للغذاء المعلب.

والشكل التالي يوضح خطوات عملية صناعة العلب المعدنية المستخدمة في تعليب الأغذية.

الشكل رقم (162) عملية صناعة العلب المعدنية المستخدمة في التعليب (يمين)، عن (Richardson, 2001) وشكل اللحام الجانبي للعلبة وطبيعة القفل المزدوج لغطاء العلبة (يسار) ، عن (Tortora *et al.*, 2010).

تلي هذه العملية عملية التسخين الابتدائي **Exhausting** والتي يقصد بها تسخين العلبة بمحتوياتها قبل القفل المزدوج **Double Seaming** مما يعمل على إزالة الهواء من أنسجة الغذاء المعبأ وبذلك يمنع حدوث تلف العلبة نتيجة وجود الأوكسجين، كما يمنع حدوث حالة ضغط على جدران العلبة أثناء تعقيمها نتيجة لتمدد هذا الهواء، ومن ثم إيجاد حالة تفريغ مما يساعد على بقاء طرفي العلبة مقعرين نوعاً مما يميز العلب السليمة عن الفاسدة المنتفخة. إضافة إلى كون هذه المعاملة الحرارية ستعمل على اختزال أعداد الأحياء المجهرية في الغذاء المعلب مما يسهم في زيادة كفاءة عملية التعقيم، كما أن طرد الأوكسجين من العبوات يؤدي إلى عدم السماح للأحياء المجهرية الهوائية بالنمو. بعد عملية التسخين الابتدائي تتم عملية القفل المزدوج للعلب من خلال بكرتين مختلفتي الدورات، الأولى تثني الغطاء مع الشفة العليا للعلبة حتى تلتف وتنحني

حافة الغطاء حول وأسفل شفة العلبة، والثانية تضغط قمة القفل سوياً حتى يصبح القفل محكم بمساعدة طبقة بلاستيكية مالئة موضوعة في الإطار الداخلي لغطاء العلبة (لاحظ الشكل التالي). وتؤدي هذه العملية لمنع تسرب الهواء إلى داخل العلب ثانية ومنع تلوثها بالأحياء المجهرية التي تسبب فساد مكوناتها، وحديثاً تتم عملية قفل العلب مع ضخ بخار لطرد الهواء من الفراغ الراسي للعلبة لإحداث التفريغ المطلوب حيث توفرت مكائن بإمكانها التفريغ والغلق في آن واحد.



الشكل رقم (163) قفل العلب مع ضخ بخار لطرد الهواء من الفراغ الراسي للعلبة لإحداث التفريغ المطلوب (يمين)، عن (Richardson, 2001)؛ عملية القفل المزدوج لغطاء العلبة مع الشفة العليا للعلبة (يسار)، عن (Campbell-Platt, 2009).

وبعد تلك العمليات يأتي دور المعاملات الحرارية، وهناك العديد من المعاملات الحرارية للغذاء المعلب منها عمليات البسترة (والتي سيتم الحديث عنا على نحو مفصل في الجزء الثالث الخاص بميكروبيولوجيا الألبان) وعمليات التعقيم **Sterilization** التي تجري للغذاء المعلب.

ويُشير التعبير (تعقيم **Sterilization**) إلى الإبادة الكاملةِ لكُلّ الأحياء المجهرية، لكن في مجال صناعة الأغذية يستعمل التعبير الأكثرَ واقعية والذي يدعى التعقيم التجاري **Commercial Sterilization**؛ حيث أنه لَيسَ بالضرورة أن يكون المنتج خالٍ مِنْ كُلّ الأحياء المجهرية، لكن الأحياء المجهرية التي تَنْجو من عمليةِ التعقيمَ من غير المحتمل أنْ تَنْمو أثناء التخزينِ وتُسبّبُ فساد المُنتَجَ (فالمعاملة الحرارية الزائدة عن الحد الضروري قد تؤدي إلى التأثير على خواص الغذاء وجودته وقيمته الغذائية).

ويعرف التعقيم التجاري **Commercial Sterilization** بأنه معاملة حرارية للأغذية المعلبة تؤدي إلى قتل جميع الأحياء المجهرية الممرضة وكذلك الأحياء المجهرية التي يمكنها النمو في الغذاء وتسبب فساده تحت ظروف التخزين والتوزيع العادية، وتتم المعاملة الحرارية للعبوات بعد إقفالها في درجات حرارة تراوح بين 100 - 121°م على حسب نوع الغذاء ودرجة حموضته (فالأغذية ذات الطبيعة المتعادلة والأغذية متوسطة الحموضة تعامل بدرجات حرارة

تتراوح بين 115,5 - 121°م في حين أن الأغذية الحامضية التي يكون قيمة الأس الهيدروجيني مساوية لـ 4,5 أو أقل فتعامل عند 100°م) لمدة تكفي للقضاء على ما يمكن أن يبقى من الأحياء المجهرية التي يمكن أن تتكاثر في شروط التخزين العادية وتُسبّبُ فساد المُنتَجَ الغذائي.

وهنالك العديد من أجهزة التعقيم منها أجهزة التعقيم غير المتحركة التي تتم فيها عملية التصنيع بالدفعة، وجهاز التعقيم هنا عبارة عن وعاء عمودي أو أفقي يعمل تحت الضغط، وتتم فيها المعاملة الحرارية ثم يعقبها عملية التبريد للعبوات وهو ما يلائم معامل التعليب الصغيرة، وهناك أيضاً أجهزة التعقيم معقمات النظام الهيدروستاتيكي والتي يمكن أن تكون إما معقمات راسية (معقمات الأبراج Tower sterilizer) أو أفقية (معقمات الضغط المتحركة المستمرة) وهي الأجهزة الدوارة التي تستلم العبوات بشكل مستمر وتسبب تحريك المحتويات الغذائية في تلك العبوات، وفي معقمات النظام الهيدروستاتيكي هذه تتم المعاملة الحرارية والتبريد في وقت واحد من خلال ثلاث مراحل هي التسخين الأولي والتعقيم والتبريد.

(1) المرحلة الأولى للتسخين في برج التسخين الأولي.

(2) المرحلة الثانية للتسخين في برج التسخين الأولي، الجزء الهيدروستاتيكي (المتوازن بضغط الماء).

(3) المرحلة الثالثة للتسخين قبيل الدخول إلى برج التعقيم.

(4) برج أو قسم التعقيم.

(5) المرحلة الأولى للتبريد في برج التبريد.

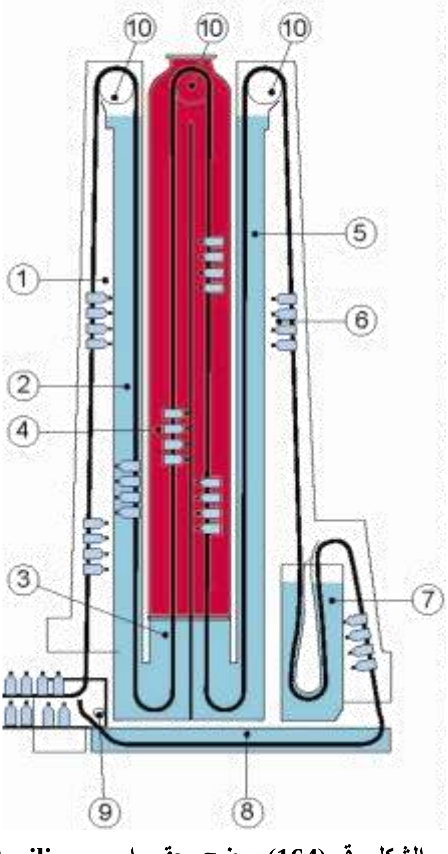
(6) المرحلة الثانية للتبريد في برج التبريد.

(7) المرحلة الثالثة للتبريد في برج التبريد.

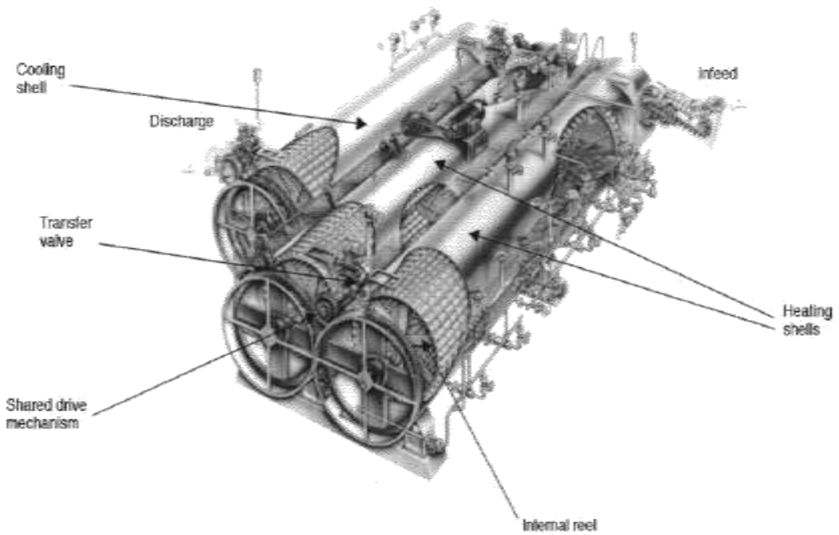
(8) المرحلة الرابعة للتبريد في برج التبريد.

(9) المرحلة النهائية للتبريد في برج التبريد.

(10) قمم الأبراج وعجلات نقل العبوات.



الشكل رقم (164) يوضح معقم راسي Tower sterilizer ومراحل التعقيم فيه، عن (Bylund, 1995).



الشكل رقم (165) يوضح وحدة تعقيم من نوع معقمات الضغط المتحركة المستمرة والمكون من ثلاث وحدات للتسخين الأولي والتعقيم والتبريد، عن (Richardson, 2001).

وكجزء من العملية التصنيعية للغذاء المعلب تأتي مرحلة التبريد **Cooling** والتي أما أن تكون منفصلة كما هو حال عمليات التصنيع بالدفعة عند استخدام أجهزة التعقيم غير المتحركة أو كجزء من المعاملة الحرارية عند استخدام معقمات النظام الهيدروستاتيكي، وتتم هذه العملية من أجل منع الطبخ الزائد (Over cooked) للمادة الغذائية المعلبة فلا يحترق طعمها أو يلين قوامها أكثر من اللازم، حيث يتم تبريد العبوات إما بنقلها من المعقِّم إلى قنوات بها ماء بارد متجدد أو بالرشاشات (كما هو الحال عند استخدام أجهزة التعقيم غير المتحركة)، أو داخل المعقمات المزودة بأنظمة خاصة للتبريد بتيار من الماء البارد، وقد يتم تبريد العبوات جزئياً بالماء البارد ثم تعريضها لتيار من الهواء البارد، وفي الغالب يضاف الكلور إلى ماء التبريد بنسبة 1 - 3 جزء في المليون.

وقبل تسويق الأغذية المعلبة يتم تخزن العبوات في مخازن جافة مهواة لمدة أسبوعين، فإذا ما ظهر أي نوع من أنواع التلف أو الفساد تتم دراسة مسبباته وتفرز العبوات لاستبعاد التالف وتقدير نسبته ومعرفة اسبابه ومن ثم تلافي أسباب هذا الفساد في عمليات التصنيع التالية.

فساد الأغذية المعلبة:

أن الهدف من عملية التعليب للأغذية هو إطالة فترة حفظها في عبوات محكمة الإغلاق حتى يتم استخدامها في غير مواسمها التي تكون فيها موجودة في حالتها الطازجة، وتهدف المعاملات الحرارية التي تُجرى للأغذية المعلبة إلى القضاء على ما يمكن أن يبقى من الأحياء المجهرية التي يمكن أن تتكاثر في شروط التخزين العادية وتُسبّبُ فساد المُنتَجَ الغذائي.

وتتعرض الأغذية المعلبة للفساد والتلف الذي يظهر على المعلبات نتيجة اسباب كثيرة تأتي في مقدمتها عدم كفاءة عملية التعقيم أو استخدام عبوات غير جيدة الصنع أو استعمال أغذية ذات جودة ميكروبية منخفضة أو عدم كفاءة عملية القفل المزدوج **Double Seaming** للعلب مما يؤدي إلى دخول الأحياء المجهرية للعلبة إما من ماء التبريد أو أثناء التخزين نتيجة لدخول الهواء من الفتحات المجهرية الناجمة عن عدم كفاءة عملية القفل المزدوج.

وتعتبر الأغذية المعلبة تالفة أو فاسدة عند حدوث أي تغيرات غير مرغوبة في صفات المادة الغذائية سواء ظهر تأثير هذا الفساد على شكل العلبة من الخارج او لم يظهر (فالشكل الطبيعي للعلبة هو ان تكون مقعرة من طرفيها نتيجة التفريغ الذي يحدث بداخلها بتأثير عملية التسخين الابتدائي فاذا حدث تحدب لطرف من اطراف العلبة او كلاهما فإن هذا يدل عادة على حدوث الفساد)، فتبدو علامات الفساد بتغير صفات المواد الغذائية المعلبة، فيصبح القوام طرياً ومتحللاً، كما قد تظهر رائحة كريهة و/أو طعم حامضي و/أو مظهر عَكِر **Turbid** للمحاليل الملحية أو السكرية في العلب، كما قد تظهر غازات H_2، CO_2، NH_3، H_2S، لكن ما يميز الفساد المصاحب لتشكل غاز H_2S هو عدم حدوث انتفاخ للعلبة بسبب قابلية ذوبان هذا الغاز في الماء. وعلى وجه العموم هناك نوعان من أنواع الفساد الذي يمكن حدوثه في الأغذية المعلبة وهما الفساد غير الحيوي والفساد الحيوي (أو الميكروبي).

1- <u>الفساد غير الحيوي للأغذية المعلبة</u>:

قد يكون الفساد غير الحيوي للأغذية المعلبة نتيجة حدوث تفاعل كيميائي بين معدن العلبة والغذاء أو بين العلبة والبيئة المحيطة ويظهر بصور مختلفة مثل تآكل معدن العلبة أو تغير لون المادة الغذائية أو التأثير على القيمة الغذائية للغذاء المعلب.

وتظهر مظاهر هذا الفساد في العلامات التالية:

أ - تكون صداء في بعض أجزاء العلبة نتيجة تفاعل معدن العلبة والأوكسجين الجوي مما يؤدي في النهاية إلى تكون الصداء الذي يؤدي إلى تآكل معدن العلبة.

ب- انتفاخ العلبة، وقد يكون ذلك نتيجة تفاعل الأغذية الحامضية مع معدن العلبة وينتج من التفاعل غاز الهيدروجين H_2 الذي يتسبب في انبعاج أغطية العلبة للخارج، وعند فتح العلبة يمكن شم رائحة معدنية، وهذا ما يحدث في بعض منتجات الطماطم المعلبة. وقد يكون الانتفاخ ناتج عن زيادة الضغط داخل العلبة ويحدث ذلك في حالة زيادة ملء العلبة وعدم ترك الفراغ الرأسي بارتفاع لا يقل عن $\frac{1}{16}$ من طول العلبة وكذلك عند عدم حدوث تفريغ كافٍ داخل العلبة، وقد يحدث انتفاخ للعلب في بعض المناطق الجبلية المرتفعة نتيجة انخفاض الضغط الجوي هناك.

ج - تغير لون المادة الغذائية أو تغير لون العلبة من الداخل، فقد يتلون الجزء العلوي من العلبة باللون البني المُسمر (لون أكسيد الحديد) نتيجة وجود الأوكسجين، وقد تتلون بعض الأجزاء المعرضة من العلبة باللون الرمادي المسوّد عندما يتوفر الكبريت في المادة الغذائية كما هو الحال في اللحوم حيث يتكون كبريتيد الهيدروجين.

د – قد تحدث بعض التفاعلات بين مكونات المادة الغذائية نفسها مما يؤدي إلى التأثير على القيمة الغذائية للغذاء المعلب كتزنخ الزيوت والدهون في المادة الغذائية أو تفاعل ميلارد الذي يحدث بين السكريات الأحادية والأحماض الأمينية ويؤدي الى تكوين مركبات معقدة داكنة اللون أو تفاعل الكرملة للسكريات وغيرها.

2- <u>الفساد الحيوى (أو الميكروبى) للأغذية المعلبة:</u>

تعتبر الأحياء المجهرية كالبكتيريا المنتجة للأبواغ الداخلية **Endospores** وعلى وجه الخصوص جنسي ***Bacillus*** و ***Clostridium*** من أهم الأحياء المجهرية التي تتسبب في فساد الأغذية المعلبة ويأتي في مقدمة أنواع هذين الجنسين النوع ***C. botulinum*** المسبب لحالات التسمم الغذائي المسمى التسمم البوتشليني **Botulism** والذي يكون سببه وجود سموم في الغذاء مفرزة بواسطة هذه البكتيريا، ولذلك فإن أهم ما يتحقق من خلال المعاملة الحرارية للغذاء المعلب هو القضاء على الخلايا الخضرية وكذلك الأبواغ الداخلية لبكتيريا ***C. botulinum***. كما أن أنواع أخرى مثل ***C. butyricum*** و ***C. sporogenes*** و ***C. thermosaccharolyticum*** وغيرها لها أدوار في فساد الأغذية المعلبة. ولا يقل انواع الجنس ***Bacillus*** أهمية في هذا المجال فمن الأنواع لهذا الجنس والتي لها علاقة بفساد الأغذية المعلبة ***B. cereus*** وتكمن أهميته في كونه مسبب للتسمم الغذائي المرتبط بتناول بعض المنتجات اللبنية الغنية في محتواها من النشا و السكريات مثل الأرز بالحليب وحلوى الكاسترد وغيرها، وهناك أيضاً أنواع مثل ***B. subtilis*** و ***B. stearothermophilus*** و ***B. coagulans*** التي تتسبب أيضاً بفساد الأغذية المعلبة.

كما قد تتسبب الأحياء المجهرية الأخرى من إحداث للفساد والتلف للأغذية المعلبة نتيجة تسربها إلى داخل العبوات بعد المعاملات الحرارية من فتحات مجهرية في العلب ناجمة عن عدم كفاءة عملية القفل المزدوج، ومن هذا الأحياء المجهرية البكتيريا غير المنتجة للأبواغ الداخلية مثل أجناس ***Lactobacillus*** و ***Leuconostoc*** و ***Streptococcus*** و ***Enterococcus*** وغيرها، وكذلك الأعفان والتي على الرغم من كونها هوائية وقدرتها على تحمل المعاملات الحرارية ضعيفة لكنها من الممكن أن تتواجد نتيجة عدم كفاءة المعاملات الحرارية أو نتيجة للتلوث بعد إجراء عمليات التصنيع، وكون الأعفان إجباراً فإن العلبة يجب أن تحتوي على فتحة تصلها بالهواء الخارجي، وهناك أيضاً الخمائر التي قد تنمو في الأغذية المعلبة نتيجة تسربها إلى داخل العبوات بعد المعاملات الحرارية.

التعرف على أنماط الفساد الحيوي (أو الميكروبى) فى الأغذية المعلبة:

عرفنا أنه يمكن تقسيم مسببات الفساد الحيوي إلى كل من البكتيريا أو الأعفان أو الخمائر، كما عرفنا أن البكتيريا تشمل تلك المنتجة و غير المنتجة للأبواغ الداخلية، ونريد هنا التعرف تفصيلاً على كل أنماط الفساد الحيوي للأغذية المعلبة، وقبل الدخول في ذلك ينبغي التأكيد على أن البكتيريا المنتجة للأبواغ الداخلية تُقسم إلى البكتيريا المحبة للحرارة العالية المنتجة للأبواغ الداخلية Thermophilic Spore-Forming والبكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة المنتجة للأبواغ الداخلية Mesophilic Spore-Forming، وبناً على ما تقدم يمكننا تقسيم أنماط الفساد الحيوي للأغذية المعلبة إلى:

أولاً ـ فساد الأغذية المعلبة بواسطة البكتيريا:

وهذا النوع من الفساد يمكن تقسيمه إلى ثلاثة مجاميع رئيسة هي:

1- فساد الأغذية المعلبة بواسطة البكتيريا المحبة للحرارة العالية المنتجة للأبواغ الداخلية:

أن غالبية أنواع الفساد الحيوي للأغذية المعلبة يكون بفعل البكتيريا المحبة للحرارة العالية المنتجة للأبواغ الداخلية Thermophilic Spore-Forming كون أبواغها أكثر مقاومة للمعاملات الحرارية من أبواغ البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة، وهناك ثلاثة أنماط من هذا النوع من الفساد هي:

(أ) الفساد الحامضى المسطح Flat Sour: وهذا الفساد لا يمكن تمييزه إلا بعد فتح العلب، حيث أن العلب تبقى طبيعية المظهر ويبقى الغطاء والقاع بشكل مستوٍ، ولا يبدو على العلبة أي علامات الانتفاخ، بينما تتكون حموضة في الغذاء المعلب، ويسبب هذا النوع من الفساد أنواع البكتيريا المحبة للحرارة العالية اختيارياً Facultatively Thermophilic مثل بكتيريا *Bacillus coagulans*، أو تلك المحبة للحرارة العالية إجباراً Obligate Thermophilic مثل بكتيريا *Bacillus stearothermophilus*، مع العلم أن المجموعة الأولى في الأساس من البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة المنتجة للأبواغ وظهورها في الأغذية المعلبة دلالة على عدم كفاءة المعاملة الحرارية فأبواغها تقتل بالمعاملة الحرارية الكفوءة، أما مجموعة البكتيريا المحبة للحرارة العالية إجباراً فلا تسبب الفساد إلا إذا بقى الغذاء المعلب حاراً لفترة وذلك يكون نتيجة البطء في عملية التبريد المفاجئ بعد عملية التعقيم التجاري أو عند خزن الغذاء المعلب في درجات حرارية عالية كما هو الحال في المناطق الحارة، ولذا ينبغي الحرص على تخزين المعلبات في مكان بارد وجاف.

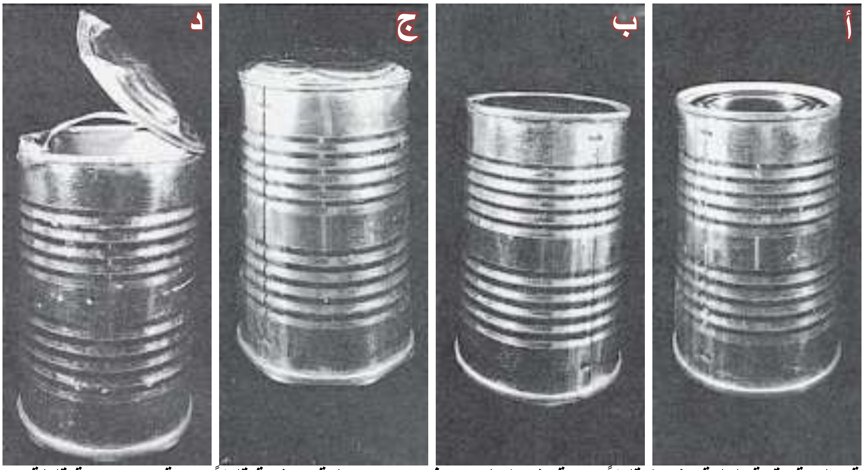
(ب) **الفساد الغازي Thermophilic anaerobic (T.A) spoilage**: هذا النوع من الفساد يكون نتيجة بكتيريا *Clostridium thermosaccharolyticum* وهي محبة للحرارة العالية لاهوائية إجباراً منتجة للأبواغ، وعند نموها في الأغذية المعلبة قليلة الحموضة (نتيجة خزن المعلبات في درجات حرارية عالية) تنتج حامض و غاز (خليط من CO_2 و H_2) لكنها لا تكون H_2S، ويرافق هذا الفساد انطلاق رائحة حامضية، كما أن تكون الغاز يؤدي إلى انتفاخ العلبة مما قد ينتهي بانفجارها، وتكون مراحل تكون الغاز في العلب على النحو التالي:

1 - الانتفاخ المستتر Flipper swell (الانتفاخ الأولي): يبدو شكل العلبة طبيعي ولكن عند طرق العلبة على سطح صلب تتجمع كميات الغاز على سطح المادة الغذائية في الفراغ العلوي فيتحدب الغطاء للخارج.

2 - الانتفاخ اللولبي Springer swell: يكون احد طرفي العلبة يكون محدبا الى الخارج وعند الضغط عليه يزول التحدب منه في حين يتحدب الطرف الأخر.

3 - الانتفاخ اللين Soft swell: يكون احد طرفي العلبة محدبا وعند الضغط عليه يزول ثم يعود مجددا.

4 - الانتفاخ الصلب Hard swell: وهو اقصى درجات الانتفاخ حيث يكون طرفي العلبة محدبين ولا يزول بالضغط وقد تنفجر عن الضغط عليها بقوة.



(أ) علبة سليمة، قمة العلبةِ مقعرة قليلاً نتيجة تفريغ الهواء فيها، (ب) علبة منتفخة قليلاً نتيجة إنتاج كمية قليلة من الغاز، (ج) انتفاخ صلب يظهر فيه طرفي العلبة محدبين، (د) يوضح شكل العلبة في الصورة ج بعد أن أُسقطت من مكان مرتفع فأدّى ضغط الغازَ إلى انفجار عَنيف مزّقَ غطاء العلبة.

الشكل رقم (166) التغيرات التي تحدث في المعلبات الغذائية نتيجة للفساد الغازي (T.A) ومراحل تكوين الغاز، عن (Madigan, *et al.* 2012).

(ج) الفساد الكبريتي النتن **Sulfur stinker** (اسوداد المعلبات): يتميز هذا الفساد بوجود رائحة كريهة (تشبه رائحة البيض المتعفن) مصدرها غاز كبريتوز الهيدروجين H_2S (الناتج عن تحلل البروتينات)، وقد يتفاعل الكبريت الموجود في الغذاء مع حديد العلبة وينتج كبريتيد الحديد **FeS** (مما يؤدي إلى اسوداد الغذاء في النهاية)، لكن ما يميز الفساد المصاحب لتشكل غاز H_2S هو عدم حدوث انتفاخ للعلبة بسبب قابلية ذوبان هذا الغاز في الماء. وسبب هذا الفساد بكتيريا ***Clostridium nigrificans*** وهي بكتيريا محبة للحرارة العالية إجباراً لاهوائية منتجة للأبواغ، ولذلك فهذا النوع من الفساد أيضاً مرتبط ببقاء الغذاء المعلب حاراً لفترة نتيجة إما البطء في عملية التبريد المفاجئ بعد عملية التعقيم التجاري أو خزن الغذاء المعلب في درجات حرارية عالية كما هو الحال في المناطق الحارة.

2- <u>فساد الأغذية المعلبة بواسطة البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة المنتجة للأبواغ الداخلية:</u>

سبب هذا الفساد أنواع البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة المنتجة للأبواغ التابعة لجنسي ***Bacillus*** و ***Clostridium***. وظهور هذا النوع من الفساد دلالة على عدم كفاءة المعاملة الحرارية للغذاء المعلب أو عدم كفاءة التفريغ. ويتميز جنس ***Bacillus*** عن جنس ***Clostridium*** بأن أنواعه هوائية أو لا هوائية اختيارية ومن أهم أنواعه التي تتسبب في فساد الأغذية المعلبة ***Bacillus macerans*** و ***B. polymyxa*** وهما من الأنواع المنتجة للغازات في الأغذية المعلبة ويطلق عليها أسم العصويات الهوائية أو **Aerobacilli**، وكذلك ***B. subtilis*** و ***B. megaterium*** وهما من الأنواع غير المنتجة للغازات. وفي حالة منتجات اللحوم المقددة المعلبة التي لم تكن معاملتها الحرارية كافية للتعقيم كما هو الحال بالنسبة لمنتج اللانشون المعلب (كما سبق وأن عرفنا) فتكون معرضة للفساد بواسطة انواع جنس ***Bacillus*** التي تنتج غاز CO_2 أوغاز N_2 أو أكاسيد النيتروجين من النترات والسكر واللحم.

أما فيما يخص الأنواع التابعة لجنس ***Clostridium*** فيأتي في مقدمتها ***C. botulinum*** المسبب لحالات التسمم الغذائي المسمى التسمم البوتشليني **Botulism**، ولذلك فإن أهم ما يتحقق من خلال المعاملة الحرارية للغذاء المعلب هو القضاء على الخلايا الخضرية وكذلك الأبواغ الداخلية لبكتيريا ***C. botulinum***.

ومن أنواع هذا الجنس مـــا يكون محلل للسكريات **Saccharolytic clostridia** مثل ***C. pasteurianum*** و ***C. butyricum*** وهذان النوعان يفسدان الأغذية المعلبة بتكوين حامض البيوتريك وغازات CO_2 و H_2 مما يؤدي إلى انتفاخ العلب. وكذلك الأنواع المحللة للبروتينات **Proteolytic clostridia** مثل ***C. putrefaciens*** و ***C. sporogenes*** وهي تتسبب في

تفسخ بروتينات الأغذية المعلبة لا هوائياً منتجة مركبات كريهة الرائحة مثل كبريتيد الهيدروجين والمركبتان والأمونيا والإندول إضافة إلى تكوينها لغازات CO_2 و H_2 التي تؤدي إلى انتفاخ العلب، وتعرف هذه البكتيريا ببكتيريا التَفَسُّخِ اللاهوائي **Putrefactive Anaerobe**.

إن أنواع بكتيريا جنس ***Clostridium*** المحللة للسكريات تكون أقل مقاومة للمعاملة الحرارية من الأنواع المحللة للبروتينات، ولذلك يُلاحظ أن الأغذية المعلبة ذات الطبيعة الحامضية (كمنتجات الطماطم والفواكه المعلبة كالكمثرى) وكذلك المعلبات المنزلية مثل المربيات ومنتجات الطماطم المعلبة منزلياً غالباً ما يكون فسادها بواسطة البكتيريا المحللة للسكريات نظراً لكون المعاملة الحرارية لهذه الأغذية تكون عند حدود 100°م، أما الأغذية المعلبة قلية الحموضة (مثل معلبات اللّحوم والأسماك والذرة) فيكون فسادها بواسطة البكتيريا المحللة للبروتينات التي تكون أبواغها أكثر مقاومة للمعاملة الحرارية. ويعتبر هذا النوع من الفساد إضافة إلى الفساد الحامضي المسطح و الفساد الغازي (**T.A. spoilage**) من أكثر أنواع الفساد شيوعاً في الأغذية المعلبة.

3- <u>فساد الأغذية المعلبة بواسطة البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة غير المنتجة للأبواغ الداخلية:</u>

إن وجود البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة غير المنتجة للأبواغ الداخلية في الأغذية المعلبة (المعاملة حرارياً بالطبع) يعد دلالة أكيدة على حدوث عيب في عملية القفل المزدوج **Double Seaming** للعلب وحدوث تنفيس (تَسَرُّب **Leakage**) للعلب يؤدى إلى دخول هذه الأحياء المجهرية للعلبة أما من ماء التبريد أو أثناء التخزين نتيجة لدخول الهواء من الفتحات المجهرية الناجمة عن عدم كفاءة عملية القفل المزدوج. ومن أمثلة هذه البكتيريا أجناس ***Lactobacillus*** و ***Leuconostoc*** و ***Streptococcus*** و ***Enterococcus*** وغيرها.

<u>ثانياً - فساد الأغذية المعلبة بواسطة الخمائر والأعفان:</u>

من المعروف أن المعاملة الحرارية للأغذية المعلبة تقضي على الخمائر والأعفان سواء كخلايا الخضرية أو جراثيم (سبورات) ولذلك فنادراً ما تسبب الخمائر والأعفان في فساد الأغذية المعلبة باستثناء تلك التي لم تخضع للمعاملات الحرارية أو تلك التي حدث لها عيب في عملية القفل المزدوج **Double Seaming** للعلب وحدوث تَسَرُّب **Leakage** أدى إلى دخولها للعلب.

وإذا حدث ذلك فإن الفواكه المعلبة والمربيات ومرطبات الفاكهة والحليب المركز قد يحدث فيها فساد بالخمائر المخمرة **Fermentative Yeasts** وبالتالي فإن العلبة يحدث لها تخمر كحولي وتتعرض للانتفاخ إذا وجدت هذه الخمائر نتيجة إنتاج غاز CO_2 كما أن الخمائر الغشائية **Film Yeasts** قد تنمو على الأغذية المخللة المعلبة مثل الزيتون الأسود والخيار المخلل المعلب وكذلك على سطح المربيات والفواكه المعلبة ومرطبات الفاكهة.

أما الأعفان فتستطيع أن تنمو على سطح المربيات ومعلبات الفواكه التي تحتوي على نسبة سكر مرتفعة وحموضة مرتفعة، ونستطيع تجنب نمو الأعفان عندما نرفع تركيز السكر إلى تركيز أعلى من 68 %، وقد لوحظ وجود أنواع مثل *Aspergillus* و *Penicillium* في أغذية معلبة بتركيز سكري يصل إلى 67,5 % لكن مع خفض الأس الهيدروجيني إلى حدود 3 مع المعاملة الحرارية عند 90°م لمدة دقيقة واحدة وجد أنه قد تم منع نمو الأعفان باستثناء تلك التي تنتج جراثيم (أبواغ) تقاوم درجات الحرارة العالية أو تُكون الأجسام الحجرية **Sclerotia**، وقد سبق وأن عرفنا في الشكل رقم (82) من هذا الكتاب كيفية الكشف عن وجود جراثيم الأعفان المقاومة للحرارة في الأغذية الخام المعدة للتصنيع. ومن الأعفان المهمة في فساد الأغذية المعلبة عفن ***Byssochlamys fulva*** الذي ينتج جراثيم زقية تقاوم درجات الحرارة العالية كما ينتج اجسام حجرية، إضافة إلى كونه يفرز إنزيمات محللة للبكتين **Pectinases**، ولذلك فهو يُشكل مشكلة لصناعة المعلبات الغذائية وخصوصاً عصير الفواكه والفواكه المعلبة.

والمخطط التالي يوضح كيفية التعرف على أسباب فساد الأغذية المعلبة:

* TA = البكتيريا المحبة للحرارة العالية اللاهوائية غير المنتجة لـ H_2S، Thermophilic Anaerobe not producing H_2S

** PA = بكتيريا التَفَسُّخِ اللاهوائي Putrefactive Anaerobe

الشكل رقم (167) مخطط يوضح أسباب فساد الأغذية المعلبة، عن (Frazier and Westhoff, 1997).

<u>الفحوصات الظاهرية التى تُجرى للأغذية المعلبة:</u>

لفحص الأغذيـة المعلبـة المنتجـة قبل تسويقها يتم أخذ عدد مناسب من العينـات التـي يتم تحضينها على درجات حرارة مناسبة لفترة زمنية معينـة، فالأغذيـة المعلبـة منخفضـة الحموضـة (pH أعلى من 4,6) يتم تحضينها عند درجة حرارة 30 – 37°م لمدة 10 أيام، أما عينات الأغذية الحامضية فتحضن عند درجة حرارة 25 – 30°م لمدة 10 أيام. وبعد انتهاء فترة التحضين تفحص العلب ظاهرياً من الخارج قبل فتحها. تتم اجراءات الفحص التمهيدي للعلب (سواء قبل تسويقها أو اختبار عينات مأخوذة من الأسواق) وفقاً للتالي:

<u>أولاً</u> - تُفحص العلبةَ للكشف عن وجود أي صدأ أو تسرب فيها كالتّالي:

1- يفحص السطحَ الخارجيَ للعلبة وتلاحظ أي علامات لوجود صدأ.

2- لاحظ منطقة تداخل (تشابك) حافات بطاقة العبوة وتطمن على حالـة البطاقـة في هذه النقطـة بتقشير الشريط اللاصق فوق منطقة اللحام.

3- بسكين حادّة أقْطعَ بطاقة العبوة بشكل عمودي، مقابل منطقة التداخل (التشابك) لبطاقة العبوة كما هو موضح في الشكل وافصله بعناية عنْ العلبـةِ لتَحديد مكان أيّ موضع به صدأ أو تبقْعَ في بطاقة العبوة ناتج عن تسرب من العلبة أو مناطق اللحام.

<u>ثانياً</u> – في حالة وجود أي موضع به صدأ أو تبقْعَ في بطاقة العبوة نـاتج عن تسرب مـن العلبـة أو مناطق اللحام نلاحظ ما يلي:

1- في حال ما إذا كانت البقع الصدئة على بطاقة العبوة منتظمـة وفاتحـة اللـون فـإن التسرب بَعِيد الاحْتِمَال.

2- إذا كـان للبقعـة الصدئة منطقـة داخليـة داكنـة فـيمكن أن تكـون العلبـة مَثْقُوبـة. عندئـذ تفحـص المنطقة الداكنة باستخدام إبرة رفيعة للتَدقيق ما إذا هناك ثُقْبَ في العلبة.

<u>ثالثاً</u> – افحص مظهر الدرزِ (اللحام) كالتالي:

1- بعد إزالة بطاقة العبوة يفحص الـدرزِ (اللحـام) بصرياً لملاحظـة أيّ إشـارات لتسربِ المُنتَجِ أَو عَدَمُ الانتظَامِ في الدرز (اللحام).

2- لاحظ الدرزَ على طول الخَطّ الموازي لجسمِ العلبة وأفحص خَطَّ الاتصال بين درزِ العلبـةِ وجسمِ العلبة لملاحظة أي عجز في إحكام الغلق.

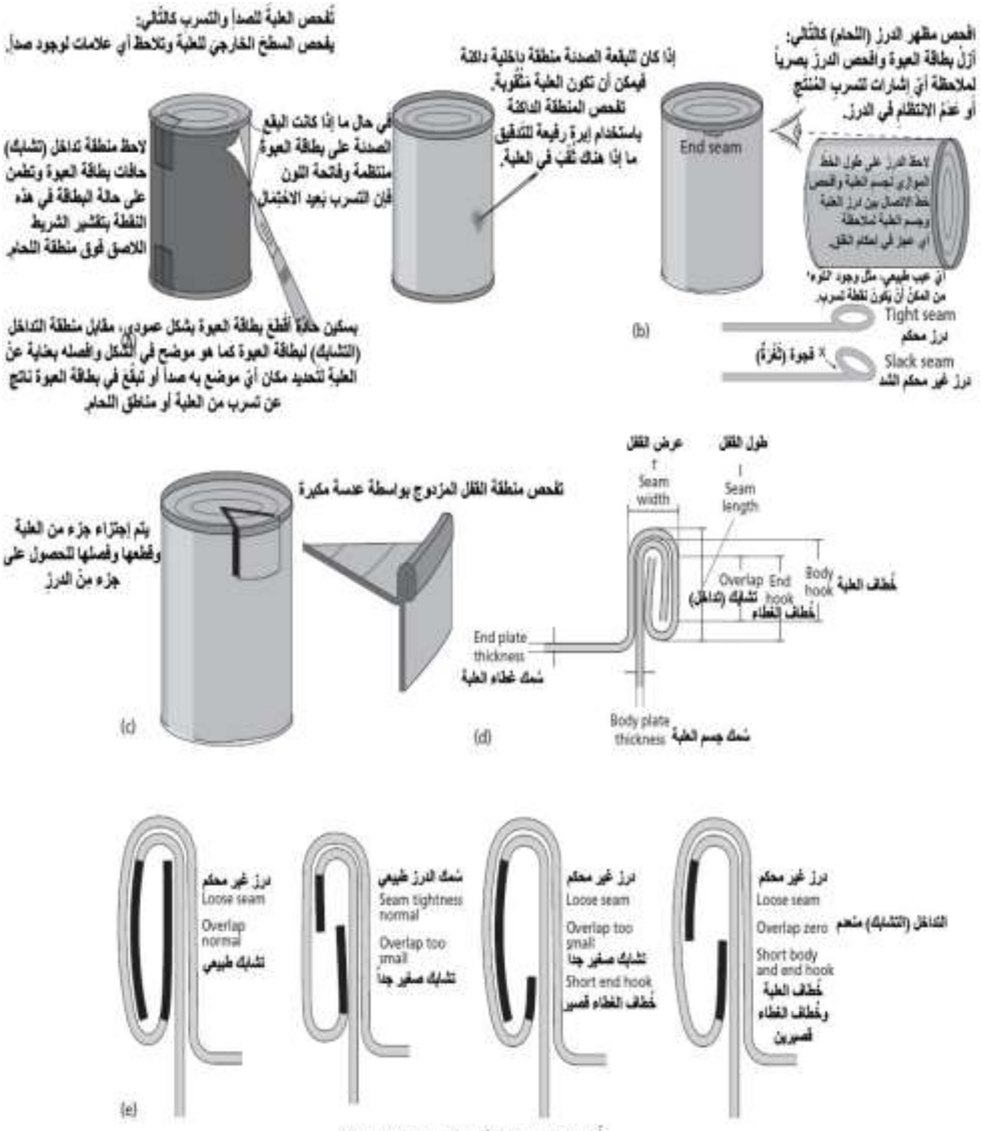
*** أيّ عيب طبيعي، مثل وجود 'نتوء' من المكنُ أَنْ يَكُونَ نقطة تسرب.**

<u>رابعاً</u> – يتم إجتزاء جزء مـن العلبـة وقطعهـا بواسـطة منشـار الغلـق الكهربـائي وفصـلها بواسـطة كماشـة قاطعة للحصـول علـى جـزء مِـنْ الـدرزِ ثـم تفحـص منطقـة القفـل المـزدوج بواسـطة عدسة مكبرة.

<u>خامساً</u> – عند فحص منطقة القفل المزدوج بواسطة عدسة مكبرة أو مسلاط (بروجيكتور) مزود بشاشة مراقبة تؤخذ أبعاد منطقة القفل المزدوج.

<u>سادساً</u> – عند فحص منطقة القفل المزدوج نلاحظ منطقة التداخل أو التشابك **Overlap** بين خُطاف العلبة وخُطاف الغطاء والتي قد تنشئ فيها بعض العيوب.

والشكل التالي يوضح اجراءات الفحص التمهيدي للعلب (سواء قبل تسويقها أو اختبار عينات مأخوذة من الأسواق):



أبعاد الدرز (التظليل الأسود يُشير إلى تداخل الدرز).

الشكل رقم (168) يوضح اجراءات الفحص التمهيدي للعلب، عن **(Roberts and Greenwood, 2003)**.

إذا لم يؤكد الفحص التمهيدي أن العلب فيها مشاكل يمكن ملاحظتها ظاهرياً، يتم فتح العلب ويلاحظ أيّ تغير في رائحة أو قوائم الغذاء المعلب أو وجود عكارة أو تغير في لونه أو مشاكل في الطلاء الداخلي للعلبة. كما يقاس الأس الهيدروجيني للغذاء المعلب ويقارن مع نتيجة الأس الهيدروجيني لغذاء في علب سليمة.

يعتبر التعقيم التجاري للأغذية المعلبة المختبرة قبل تسويقها غير كفوء (وكذلك عينات الأغذية المعلبة المأخوذة من الأسواق تعتبر فاسدة) إذا ما لوحظ عليها وجود عيوب في القفل المزدوج أو اللحام الجانبي أو لوحظ عليها أي علامات انتفاخ أو ظهور أيّ تغير في رائحة أو قوائم الغذاء المعلب أو وجود عكارة أو تغير في لونه أو أيّ تغير ملحوظ في الأس الهيدروجيني للغذاء المعلب أو أيّ دليل آخر على النمو الميكروبي. والشكل التالي يوضح بعض من المشاكل والعيوب في القفل المزدوج واللحام الجانبي واثناء عملية طبع البيانات (الترميز) على العلب.

الشكل رقم (169) صور لبعض المشاكل والعيوب في القفل المزدوج واللحام الجانبي واثناء عملية ترميز العلب، عن (FAO, 1998).

الفحوصات الميكروبيولوجية التي تُجرى للأغذية المعلبة:

في حالة الأغذية المعلبة منخفضة الحموضة (pH أعلى من 4,6)، تحضن العلب ذات المظهر الطبيعي أو التي يبدو عليها انتفاخ مستتر عند درجة حرارة 35°م لمدة 14 يوم، (كما تحضن مجموعة مساوية من العلب أيضاً عند درجة حرارة 55°م). تختار ست علب طبيعية المظهر أو ذات انتفاخ مستتر لإجراء الفحوصات الميكروبيولوجية، كما يتم عمل غشاء مجهري مباشر للغذاء ويتم إجراء الفحوصات الحسية عليه.

وعند الفحص الميكروبيولوجي على العلب تغسل العلبة من الخارج بالماء الساخن والصابون ثم تغمر في محلول مطهر لمدة لا تقل عن 10 دقائق بعدها ترفع العلبة من المحلول المطهر ويجفف طرفها العلوي جيدًا بالقطن المعقم ثم يمسح بقطعة قطن (أو قماش مسامي) مبللة بالإيثانول بتركيز 70 % ويمرر اللهب فوقها قبل تغطيتها بطبق بترى معقم، (أما إذا كانت العلبة منتفخة فلا تعرض للهب). وفي حال العلبة غير المنتفخة يثقب الطرف العلوي من غطاء العبوة باستخدام مثقب (معقم في لهب مصباح بنزن حتى الاحمرار) ثم يوسع الثقب بحيث يصبح قطره حوالي 2,5 سنتيمتر وتغطى العلبة مباشرة بطبق بترى معقم.

اما في حالة العلبة المنتفخة يؤخذ قمع معدني أو زجاجي ويمرر في ساقه قضيب طويل من الفولاذ غير القابل للصدى ويحشى الفراغ الفاصل بين القضيب ونهاية ساق القمع بالقطن، ثم يلف القمع والقضيب الفولاذي برقائق الالومنيوم (ورق القصدير) ويعقم بالمؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121,1°م لمدة 15 دقيقة. وعند الاستعمال يوضع القمع مقلوبًا فوق العبوة المنتفخة الموضوعة في وعاء ضحل ويطرق القضيب بمطرقة ضربة حادة لثقب العبوة، وعند الثقب ينطلق الغاز المحتجز داخل العلبة بمصاحبة المحلول السائل داخل العلبة (على هيئة رذاذ قوي) لكنه يُحتجز داخل مخروط القمع ثم لا يلبث أن يتساقط على جوانب المخروط ولا ينطلق الرذاذ عبر ساق القمع بسبب الحشوة القطنية. ثم يوسع الثقب وتغطى العلبة مباشرة بطبق بتري معقم.

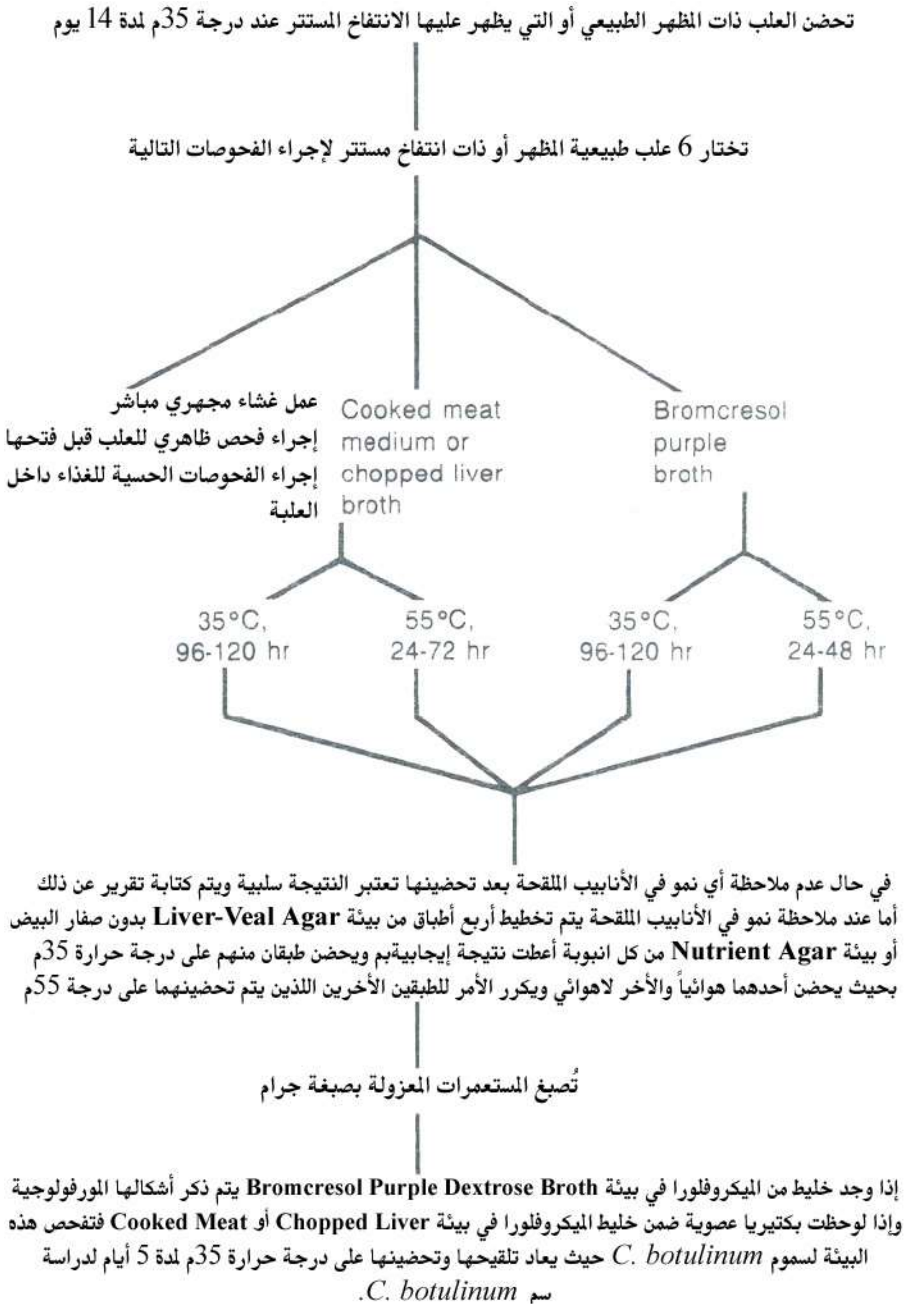
تُلقح 4 أنابيب من بيئة مرق (حساء) الكبد المفروم Chopped Liver Broth أو بيئة مرق اللّحم المطبوخ Cooked Meat Broth، و 4 أنابيب من بيئة مرق الديكستروز وبرومكيرزول الأرجواني Bromcresol Purple Dextrose Broth، بحيث يوضع في كل انبوبة 1 – 2 مليلتر من سائل المنتج أو خليط المنتج والمحلول المالئ أو 1 – 2 جرام من الغذاء الصلب، من كل غذاء معلب.

تُحضن أنبوبتان من بيئة Chopped Liver (أو Cooked Meat) على درجة حرارة 35°م لمدة 96 - 120 ساعة، والأنبوبتان الآخرتان على درجة 55°م لمدة 24 - 72 ساعة، كما تُحضن أنبوبتان من بيئة Bromcresol Purple Dextrose Broth على درجة حرارة 35°م لمدة 96 - 120 ساعة، والأنبوبتان الآخرتان على درجة 55°م لمدة 24 - 48 ساعة.

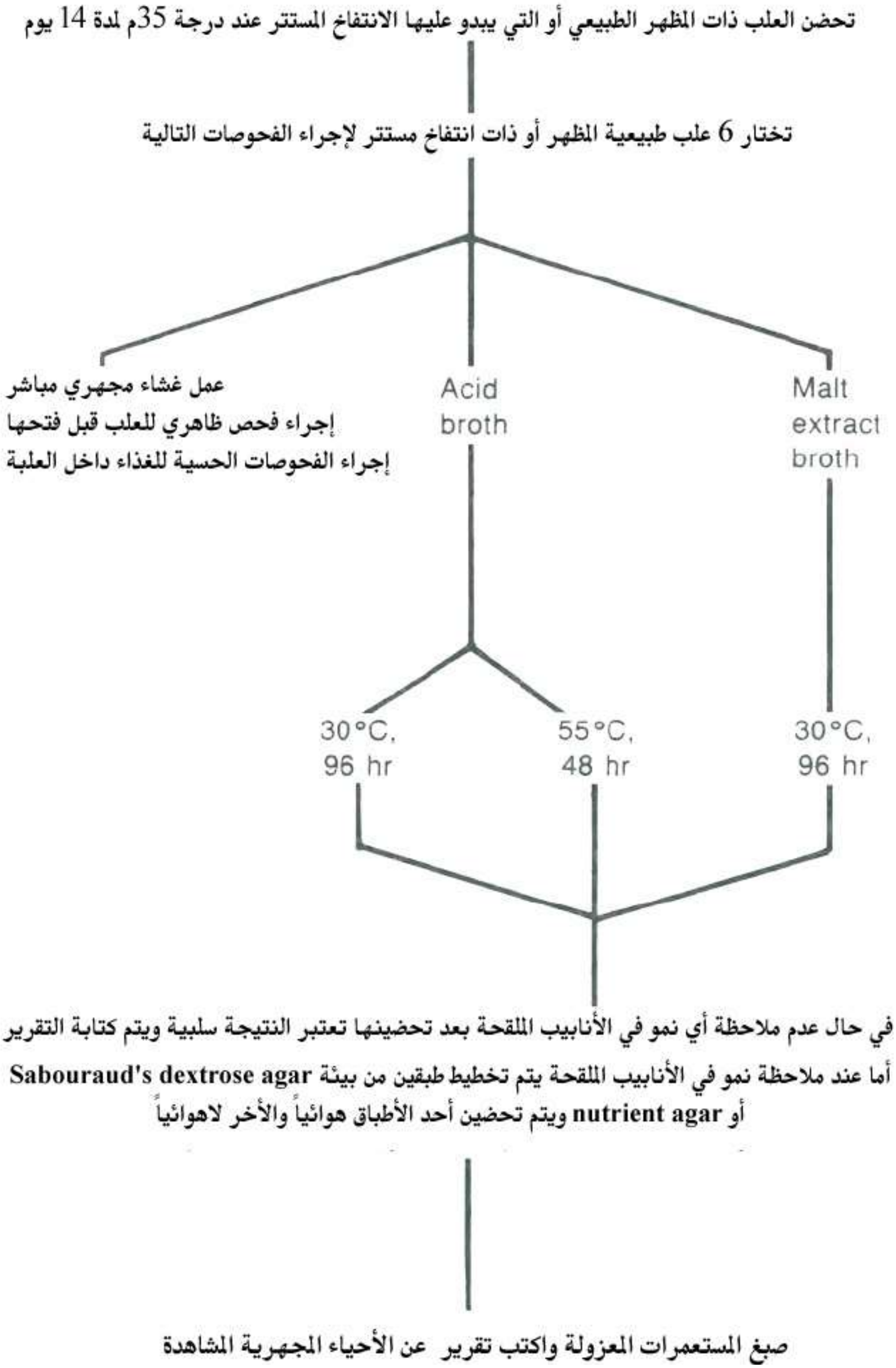
في حال عدم ملاحظة أي نمو في الأنابيب الملقحة بعد تحضينها تعتبر النتيجة سلبية ويتم كتابة تقرير عن ذلك، أما عند ملاحظة نمو في الأنابيب الملقحة يتم تخطيط أربع أطباق من بيئة Liver-Veal Agar بدون صفار البيض أو بيئة Nutrient Agar من كل انبوبة أعطت نتيجة إيجابية، ويحضن طبقان منهم على درجة حرارة 35°م بحيث يحضن أحدهما هوائياً والأخر لاهوائي، وكذلك يكرر الأمر للطبقين الأخرين اللذين يتم تحضينهما على درجة 55°م. يؤخذ من كل نوع من المستعمرات المختلفة ولقح أنابيب بيئة Chopped Liver (أو Cooked Meat) بنفس الكيفية الموضحة سابقاً وحضنها لفترة ملائمة من الوقت (للحصول على نمو كافٍ في البيئة الملقحة). بعد الحصول على عزلات نقية تُخزن المزارع للحفاظ على حيويتها.

إذا وجد خليط من الميكروفلورا في بيئة Bromcresol Purple Dextrose Broth يتم ذكر أشكالها المورفولوجية. وإذا لوحظت بكتيريا عصوية ضمن خليط الميكروفلورا في بيئة Chopped Liver (أو Cooked Meat) فتفحص هذه البيئة لسموم *C. botulinum* حيث يعاد تلقيحها وتحضينها على درجة حرارة 35°م لمدة 5 أيام لدراسة سم *C. botulinum*.

أما في حالة الأغذية المعلبة ذات الطبيعة الحامضية (4,6 pH أو أقل) فيتم تلقيح 4 أنابيب من Acid broth اثنتان مهما تُحضن على درجة حرارة 30°م لمدة 96 ساعة، والأنبوبتان الآخرتان على درجة 55°م لمدة 48 ساعة، وكذلك أنبوبتان من بيئة Malt extract broth (للأعفان والخمائر) يتم تحضينها على درجة حرارة 30°م لمدة 96 ساعة. وفي حال عدم ملاحظة أي نمو في الأنابيب الملقحة بعد تحضينها تعتبر النتيجة سلبية ويتم كتابة تقرير عن ذلك. أما عند ملاحظة نمو في الأنابيب الملقحة يتم تخطيط طبقين من بيئة Sabouraud's dextrose agar أو بيئة nutrient agar ويتم تحضين أحد الأطباق هوائياً والأخر لاهوائياً، تُصبغ المستعمرات المعزولة ويكتب تقرير عن الأحياء المجهرية المشاهدة.



الشكل رقم (170): يوضح إجراءات الزرع للأغذية المعلّبة المنخفضة الحموضة، عن (Andrews, 1992).



الشكل رقم (171): يوضح إجراءات الزرع للأغذية المعلّبة ذات الطبيعة الحامضية، عن (Andrews, 1992).

تفسير نتائج الفحوصات الميكروبيولوجية:

بأي حال من الأحول ينبغي التأكيد على أنه لا استنتاجات جازمة قد تلفت الانتباه من ملاحظة المزارع في الأنابيب الملقحة إذا نتج عن تلقيح الغذاء فيها لأي تعكر أولي، وبالتالي لابد من عملية التلقيح لمزارع ثانوية لتحديد وجود النمو من عدمه.

وفي حال فقط وجود بكتيريا مكونة للأبواغ نمت عند درجة حرارة 35°م في علبة ليس بها عيوب في القفل المزدوج أو اللحام الجانبي وبدون وجود تَسَرُّب فيها، وكانت مقاومتها الحرارية مساوية أو أقل من بكتيريا *C. botulinum* فذلك دلالة أكيدة على عدم كفاءة المعاملة الحرارية.

الفساد بواسطة البكتيريا اللاهوائية المحبة للحرارة العالية مثل *C. thermobutylicum* يمكن الاستدلال عليه من خلال تكون غاز ورائحة شبيهة بالجبن عند التحضين على درجة حرارة 55°م في بيئة Cooked Meat Medium.

الفساد بواسطة البكتيريا المنتجة للأبواغ المحبة للحرارة المعتدلة مثل *B. coagulans* و *B. thermoacidurans* و/أو تلك المحبة للحرارة العالية مثل *B. stearothermophilus* (الفساد الحامضي المسطح) للأغذية الحامضية أو منخفضة الحموضة يمكن الاستدلال عليه من خلال إنتاج الحامض في أنابيب بيئة Bromcresol Purple Dextrose Broth المحضنة على درجة حرارة 35°م و 55°م.

أما الفساد ببكتيريا *C. botulinum* و *C. sporogenes* و *C. perfringens*، فيمكن الاستدلال عليه من خلال تكون غاز ورائحة مُتَفَسِّخة عند التحضين على درجة حرارة 35°م في بيئة Cooked Meat Medium، كما يمكن مشاهدة أبواغ البكتيريا والشكل المميز لجنس *Clostridium* (Clostridial forms) عند الفحص المجهري. ودوماً يُختبر معلق لهذه المزارع للكشف عن السم الوشقي Botulinal toxin (كما تم توضيحه في الفصل الرابع) حتى في حالة عدم وجود السم في المنتج المفحوص، وعندما تكون النتيجة إيجابية فذلك مؤشر خطر على الصحة العامة يستلزم معه سحب كل الوجبة الإنتاجية (التي تحمل نفس الرمز) من الأسواق، وفي حال ما إذا كان الفحص للأغذية المعلبة المنتجة قبل تسويقها فيتم إتلاف كامل الوجبة الإنتاجية.

العوامل المؤثرة في أعداد الأحياء المجهرية في الأغذية المعلبة:

1 - **حموضة الغذاء (الأس الهيدروجيني pH):** عرفنا في بداية هذا الجزء أن للأس الهيدروجيني للغذاء تأثير كبير على درجة مقاومة أبواغ البكتيريا للحرارة، ففي الأغذية ذات الأس الهيدروجيني المتعادل تكون مقاومة الجراثيم البكتيرية للحرارة في حدها الأقصى، أما في الأغذية الحامضية التي يقل فيها الأس الهيدروجيني عن 5 فتقل مقاومة أبواغ البكتيريا للحرارة كثيراً وتحتاج إلى وقت قليل لإبادتها وقد تمت الاستفادة من هذه الخاصية الأخيرة في تعقيم بعض الخضروات التي تتأثر بالدرجات الحرارية العالية عند تعقيمها فبهذه الحالة يتم إضافة حامض للمحلول الملحي المعبأ في هذه العلب من أجل خفض مقاومة هذه الكائنات الحية والقضاء عليها في درجات حرارة واطئة. وقد عرفنا أيضاً في مقدمة هذا الجزء (الفصل الثالث) كيف قسمت الأغذية حسب قيم الأس الهيدروجيني لها إلى مجاميع مختلفة.

لكن ينبغي التأكيد على أن الاختلافات الموجودة في مقاومة أبواغ البكتيريا للحرارة في مختلفة الأغذية لا يجب أن تفسر على أساس قيم الأس الهيدروجيني فقط فهناك عوامل أخرى سيتم استعراضها تباعاً.

2 - **تركيز المحاليل الملحية والسكرية المضافة للعلب:** تضاف المحاليل للعلب لتسهيل انتقال الحرارة إثناء المعاملة الحرارية للغذاء المعلب، فالحرارة في السوائل تنتقل بالحمل وهي من اسرع طرق انتقال الحرارة، وهذه المحاليل قد تكون ملحية أو سكرية حسب طبيعة الغذاء المعلب. ويتراوح تركيز المحاليل الملحية ما بين 4 – 8 % حسب طبيعة الغذاء المعلب، وكلما زاد تركيز الملح كلما زاد تأثير الحرارة على أبواغ البكتيريا، إلا أن زيادة كمية الملح غير مرغوبة لأسباب صحية وغذائية.

أما فيما يخص المحاليل السكرية فقد وجد أنه كلما ازداد تركيز السكر زادت مقاومة أبواغ البكتيريا للحرارة وقد لوحظ أيضاً أنه عند تسخين الخمائر والأعفان في تراكيز متزايدة من السكر زاد تحملها ومقاومتها الحرارة، وقد لوحظ أن التركيزات القليلة من السكر لا تعطي مثل هذه الحماية للأبواغ فالفواكه المعبأة بالمحلول السكري تحتاج إلى درجة حرارية أعلى لتعقيمها من الفواكه المعبأة بدون محلول سكري. ويعتقد بأن السبب في زيادة مقاومة أبواغ البكتيريا للحرارة في المحاليل السكرية يعود إلى التجفيف الجزئي لبروتوبلازم الخلية وحماية البروتين من التكتل (فقد لوحظ بأن السكر يحمي بروتين الألبومين للبيض من التكتل).

3 - <u>وجود النشا والتوابل والزيوت في الأغذية المعلبة:</u> لوحظ أن النشا يشجع نمو الأحياء المجهرية في البيئات الإنمائية المختبرية بأعداد كبيرة مقارنة مع البيئة التي تخلو من النشا ويعتقد بأن النشا يلعب دوراً مهماً في امتصاص المركبات التي تعيق النمو كما أن النشا كمادة عضوية بحد ذاتها لا تؤثر على المقاومة الحرارية لأبواغ البكتيريا كما يزيد النشا من كثافة الغذاء الذي يتواجد فيه فيغير نمط التوصيل الحراري من نوع الحمل Convection إلى نوع التوصيل Conduction مما يتسبب في إعاقة نفاذية الحرارة ولذلك يتطلب وقت أكثر لقتل الكائنات الحية وأبواغها. وفيما يخص وجود التوابل فقد لوحظ بأن الزيوت الطيارة تقلل المقاومة الحرارية لأبواغ البكتيريا. أما وجود الدهون والزيوت في الأغذية المعلبة فتشكل عائقاً في سرعة قتل أبواغ البكتيريا بالحرارة الرطبة فقد تم عزل خلايا خضرية من البكتيريا غير مقاومة للحرارة من السمك المعلب بالزيت بعد تعقيمه على درجة حرارة عالية وذلك لأن الحرارة الرطبة لا تنفذ عن طريق الدهون لقتل أبواغ البكتيريا ولهذا فيضاف محلول ملحي إلى الزيت الموجود في عبوات السمك المعلب كما ينبغي الحرص على زيادة درجة حرارة و الفترة الزمنية عند المعاملة الحرارية للسمك المعلب بما يضمن القضاء على أبواغ البكتيريا التي يمكن أن تنمو في ظروف التخزين.

حسابات الإبادة الحرارية للأحياء المجهرية في الأغذية المعلبة:

تعتبر الحرارة قاتلةُ للأحياء المجهرية، لكن كُلّ نوع لَهُ تَحَمّلُه الخاصُ للمعاملة الحرارية. أثناء عملية التحطيم الحراري للأحياء المجهرية مثل البسترةِ أو التعقيم أو المعاملة بالحرارة الفائقة Ultra high temperature، و يكون معدل الموت الحراري للأحياء المجهرية ذو طبيعة لوغاريتمية، كما هو الحال في معدل النمو، وبالتالي فإن البكتيريا التي عوملت بالحرارة تُقتل بمعدل نسبي قياساً إلى عدد الأحياء المجهرية الموجودة. إنّ العمليةَ تعتمد على كلٍ من درجة الحرارة التي تتعرّض لها هذه الأحياء المجهرية والوقتِ اللازم في هذه الدرجةِ الحراريةِ للإنْجاز النسبةِ المطلوبةِ مِنْ الموت الحراري لهذه الأحياء المجهرية.

وبالتالي فإن الحسابات الحرارية تَتضمّن الحاجةَ لمعرفةِ تركيزِ الكائنات الحيّة المجهرية الّتي سَتحطم، والتركيز المقبول للكائنات الحيّة المجهرية الذي يُمْكِنُ أَنْ يَتبْقى بعد المعاملة الحرارية (على سبيل المثال، أحياء مجهرية مسببة للتلف ولكن لَيست أحياء مجهرية ممرضة)، المقاومة الحرارية للأحياء المجهرية المستهدفة (الأكثر مقاومة حرارية)، والعلاقةَ بين درجة

الحرارة و الوقت المتَطلّب للقضاء على هذه الأحياء المجهرية المستهدفة من هذه المعاملة الحرارية.

إنّ مدى الحرارة المطلوبة للمعاملة الحرارية يتحدّد بالمقاومة الحرارية للإنزيم أو الكائن المجهري الأكثر مقاومة للحرارة في الغذاء. على سبيل المثال، بسترة الحليب من الناحية التاريخية تستند على القضاء الأحياء المجهرية الأكثر مقاومة للحرارة من بين الأحياء المجهرية المرضية ولذلك ولسنين عديدة وحتى العام 1950م كان الحليب يُبستر عند درجة حرارة 61.6°م لمدة 30 دقيقة، وذلك بهدف القضاء على الأحياء المجهرية المرضية والتي كانت البكتيريا المسببة لمرض السل *Mycobacterium tuberculosis* أكثرها مقاومة حرارية، ولذا فإن الحليب يجب أن يعامل حرارياً للقضاء عليه، ولكن عند معرفة أن الحليب يمكن أن ينقل المرض المعروف باسم الحمى المجهولة Query fever حمى كيو (Q Fever) عندما يتلوث الحليب بالبكتيريا *Coxiella burnetii* والتي تقتل عند تسخين الحليب على درجة حرارة 62.8°م لمدة 30 دقيقة، لذلك فقد عدلت التشريعات بعد ذلك التاريخ لتصل لهذه الدرجة والوقت. وبالتالي فإنهُ بمعرفة أي مسبب مرضي جديد، فإن العلاقة بين درجة الحرارة المطلوبة و الوقت اللازم للمعاملة الحرارية تفحص بشكل مستمر.

منحنيات زمن الموت الحراري Thermal death time curves:

لقد توصل الباحثين خلال السنوات العديدة الماضية إلى أن للأحياء المجهرية ما يعرف بزمن الموت الحراري (Thermal death time)، و يعرف وقت الموت الحراري (TDT) بأنه الوقت اللازم تحت درجة حرارة معينة للقضاء على عدد معلوم من خلايا الميكروبات الخضرية الحية أو أبواغها تحت ظروف تجريبية معينة. وهناك العديد من الطرق المختبرية لدراسة تأثير الحرارة على الأحياء المجهرية وأكثرها شيوعاً في الاستخدام طريقة الأنابيب الزجاجية. وتجرى هذه العملية بوضع عدد معين من الأبواغ (الجراثيم) القياسية (أو الخلايا الخضرية) في محلول أو وسط غذائي بداخل أنابيب اختبار صغيرة مسدودة موضوعة في حمام مائي أو زيتي فيه درجة الحرارة ثابتة. وترفع الأنابيب من الحمام المائي بعد كل فقرة محددة، وتبرد مباشرة وتحضن كما هي أو بعد زراعتها في وسط غذائي ملائم لمعرفة مدى النمو في كل معاملة حرارية (أي معرفة مدى مقاومة الأحياء المجهرية في المعاملات المختلفة). ويمكن القول أن الأحياء المجهرية تختلف بالنسبة للوقت ودرجة الحرارة اللازمة للقضاء عليها بالحرارة، ويعرف زمن الموت الحراري على أنه الزمن اللازم لقتل الميكروبات عند درجة حرارة معينة في وسط معين. ومن البديهي أن ندرك حقيقة أنه للقضاء على الأحياء المجهرية بالحرارة فإن العوامل المختلفة كنوع الوسط، وعمر هذه

الأحيـاء المجهريـة، والأس الهيـدروجيني *pH*. . . إلـخ يجـب أن تؤخـذ بعـين الاعتبـار. فالأحيـاء المجهريـة تمـوت بـالحرارة بطريقـة منتظمـة ومـن الممكـن التنبؤ بقتلهـا بعمـل عدد مـن المنحنيـات للأحياء المجهرية التـي لـم تتـأثر بالمعاملـة الحراريـة Survivors curves. و يكـون نمـط المـوت متشابها تقريبا لجميع الأحياء المجهرية وحيدة الخليـة ويعتبـر ذات طبيعـة لوغاريتميـة. بمعنـى أنـه خـلال فتـرة زمنيـة معينـة عنـد درجـة حـرارة معينـة سيتم القضـاء علـى نسبة محـددة مـن الأحيـاء المجهرية بغض النظر عن العدد الكلي للأحياء المجهرية المتواجدة في الغذاء.

وبعد الحصول على بيانـات مقاومة الأحياء المجهرية للحرارة، هنـاك عدة مقـاييس يمكن أن تساعدنا لعمل الحسابات الحراريـة وتحديد معدل المـوت الحراري. ومـــن هذه المقـاييس قيمـة D ‏(D value) أو مـا تعرف بــ Decimal Reduction Time الـذي يعتبـر مقيـاس للمقاومـة الحرارية للكائن المجهري، وهذه القيمة تعني الزمن اللازم (بالدقائق) لتدمير دوره لوغاريتمية من الأحيـاء المجهريـة ذات المقاومـة الحراريـة العاليـة (تقليل أعداد الأحيـاء المجهريـة إلـى 1/10 مـن العدد الأصلي أو القضاء على 90 % من الأحياء المجهرية)، وبالتالي تدمير أو قتل جميـع الأحيـاء المجهرية الأُخرى ذات المقاومة الحرارية الأقل من النوع الأول.

على سبيل المـــثال إذ كانـت قيمـة D ‏(D value) تساوي واحد عنـد درجـة حـرارة 85°م فذلك يعني أن كل دقيقة من المعاملـة الحراريـة عنـد درجـة حـرارة 85°م تـؤدى إلـى تخفيض أعداد الأحياء المجهرية المستهدفة بهذه العملية بنسبة 90 %.

ومن الممكن استخراج قيمة D ‏(D value) رياضيـاً إذا كـان عدد الأحيـاء المجهريـة قبـل المعاملـة الحرارية وكذلك عدد الأحياء المجهرية بعد المعاملة الحرارية لفترة زمنية محددة معلوماً فيكون:

$$T = D\ (\log_{10}a - \log_{10}b)$$

حيث أن T = فترة التسخين بالدقائق.

a = عدد الأحياء المجهرية قبل المعاملة الحرارية.

b = عدد الأحياء المجهرية بعد المعاملة الحرارية.

فلـو افترضـنـا أن قيمـة a تسـاوي 10,000 خليـة متجرثمـة و أن قيمـة b تسـاوي 2 خليـة متجرثمـة وقيمـة T تسـاوي 4 دقـائق وكانـت درجـة حـرارة المعاملـة الحراريـة 115.6°م فـــــإن قيمـة D ‏(D value) تساوي:

$$4 = D\ (\log_{10} 10{,}000 - \log_{10} 2)$$

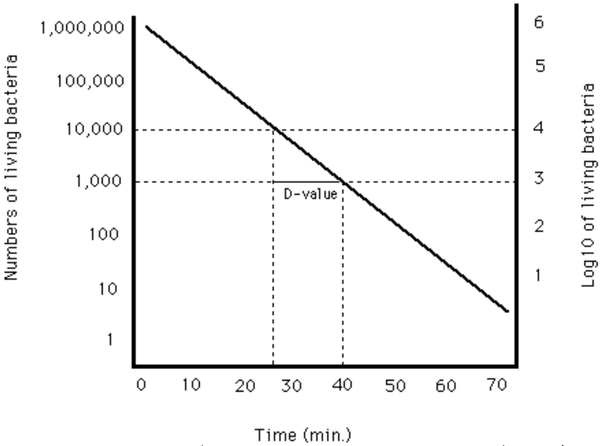
$$D = 4 / (4 – 0.301) = 1.08 \text{ min.}$$

ولـو افترضـنـا أن الغـذاء الموجـود فـي العلبـة يحتـوي علـى مليـون خليـة متجرثمـة وقـد استلمت هذه العلبة كمية من الحرارة لوقت معين يساوي 4 D فالنـاتج هو أنهـا لا تزال تحتوي علـى 100 خلية متجرثمة فلو كان هنـاك 100 علبة من هذا النـوع وبنفس الحمولـة البكتيريـة (المجمـوع

100 مليون خلية متجرثمة) ثم استلمت حرارة لوقت معين يساوي 7 D ليبقى في النهاية 10 خلايا متجرثمة، فمن المحتمل فساد 10 علب وتعقيم 90 علبة. والمعتاد في الحسابات هو أن نحسب الوقت على أساس 12 D (نضع سقف عالي من الأمان) أي أن العدد الأصلي من الخلايا يهبط 12 دورة لوغاريتمية ومع كل هذا ولكون موت البكتيريا لوغاريتمي فان العدد لا يهبط إلى الصفر وإنما نظرياً أو إحصائياً بعد 12 D يتبقى تقبل وجود خلية متجرثمة واحده. فلو كان الغذاء في العلبة ملوث بمقدار (100.000) خلية متجرثمة/علبة فبعد إعطائه 12 D من الناحية النظرية ستكون هناك علبة واحدة تحتوي على خلية متجرثمة من مجموع 10 ملايين علبة (وهذا ما يسمى بمفهوم أو مصطلح 12 D) وبمعنى آخر أن جميع هذه العلب ستكون معقمة وسليمة ماعدا واحدة ستبقى غير معقمة وهذا مجرد احتمال نظري ضعيف.

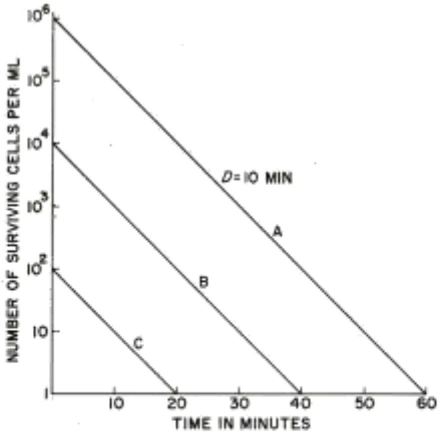
وعادةً المعاملة الحرارية التي تعطي 12 D تكون مصممة أصلاً لتعقيم بكتيريا من جنس *Clostridium* وهي السلالة PA-3679 (PA= Putrefactive anaerobe) وهي تشبه *C. sporogenes*، وهي أكثر مقاومة حرارية من بكتيريا *C. botulinum* وهي أيضاً مكونة للجراثيم (الأبواغ)، لاهوائية ومسببة للتلف إلا أنها غير سامة مما يجعل من السهولة تنميها في الأوساط الإنمائية التجريبية، وبالتالي عند حساب المعاملة الحرارية التي تكون كافية لهلاك بكتيريا PA-3679 فإن ذلك يعطينا دليل قاطع على هلاك بكتيريا *C. botulinum* الأكثر خطورة لكونها أقل مقاومة حرارية من السلالة PA- 3679.

كذلك هناك بكتيريا أخرى هي *Bacillus stearothermophilus* (FS-1518) أيضاً تستعمل لهذا الغرض. الشكل التالي يوضح أن قيمة D (D value) تساوي 14 دقيقة (من 26 إلى 40) تكون ممثلة للمعاملة الحرارية عند درجة حرارة 72°م مثلاً.



الشكل رقم (172) يوضح أن قيمة D (D value) تساوي 14 دقيقة (من 26 إلى 40)، عن (Goff, 2008).

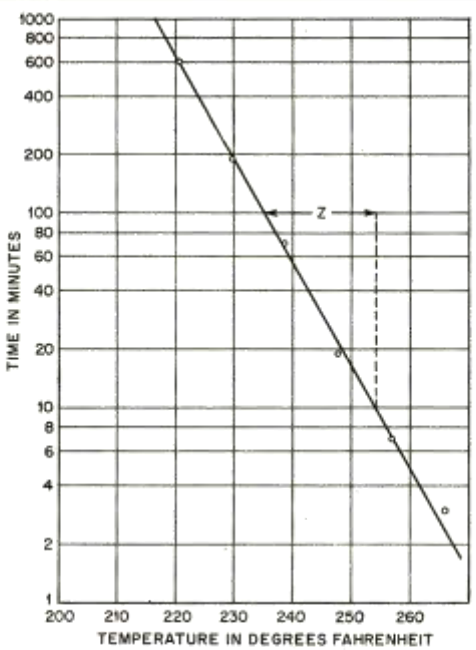
وكلما كان أعداد الأحياء المجهرية قبل المعاملة الحرارية كبيراً كلما طال الوقت اللازم لاختزال أعدادها إلى خلية واحدة/مليلتر، والشكل التالي يوضح أنه عندما تكون قيمة D (D value) تساوي 10 دقائق فإن تخفيض أعداد الخلايا المجهرية من مليون خلية/مليلتر إلى خلية واحدة/مليلتر يتطلب 60 دقيقة، في حين أن ذلك يتطلب 20 دقيقة فقط إذا كان أعداد الأحياء المجهرية قبل المعاملة الحرارية 100 خلية/مليلتر، ونظرياً يصبح هناك 0.01 خلية/مليلتر بعد 80 دقيقة من المعاملة الحرارية.



الشكل رقم (173) يوضح الوقت اللازم لاختزال أعداد الأحياء المجهرية إلى خلية واحدة/مليلتر، عندما تكون قيمة D (D value) تساوي 10 دقائق، عن (Goff, 2008).

وقد لا تكون منحنيات الأحياء المجهرية التي لم تتأثر بالمعاملة الحرارية على شكل خطوط مستقيمة دائماً ويعزى التحدب في الرسوم البيانية إلى تجمع الخلايا المجهرية (أو تجمع الأبواغ) أو إلى قدرة الخلايا المتضررة على إصلاح بعض الضرر الذي أصابها. وترسم أزمنة الموت الحراري على ورق شبه لوغاريتمي Semi-logarithmic paper على هيئة لوغاريتمية، في حين ترسم درجات الحرارة على هيئة عددية وذلك لإعطاء رسم بياني لزمن الموت الحراري كما يتضح من الشكل التالي. ويشير الخط المستقيم أن نمط الموت بواسطة الحرارة يكون لوغاريتمياً، أو بعبارة أُخرى يكون معدل الموت ثابتاً. ويمكن تقدير أزمنة الموت الحراري للدرجات الحرارية والفترات الزمنية غير المدرجة من خلال الخط البياني أو امتداده. ويدعى انحدار الخط البياني بعد تعديلات معينة قيمة Z (Z value)، وقيمة Z هي عبارة عن الدرجات الحرارية المطلوبة لمنحنى زمن الموت الحراري أن يتخطى دوره لوغاريتمية واحدة، أو بمعنى أخر قيمة Z تمثل درجات الحرارة اللازمة لتخفيض زمن الموت الحراري 10 مرات، وهناك قيمة مهمة جداً يمكن معرفتها

من منحنى زمن الموت الحراري TDT curve وتدعى قيمة F (F value) وتمثل الزمن المطلوب لإهلاك الكائن المجهري في وسط معين عند درجة حرارة 250° فهرنهيت (121.1°م). وفي الشكل التالي قيمة Z تساوي 19° فهرنهيت و قيمة F تساوي حوالي 17 دقيقة.



الشكل رقم (174) يوضح أن قيمة Z (Z value) تساوي 19° فهرنهيت وقيمة F (F value) تساوي حوالي 17 دقيقة، عن (Frazier and Westhoff, 1997).

هناك علاقة ثابتة بين مقدار الوقت للمقاومة الحرارية وبين الحرارة المهلكة وعليه فمن الممكن قياس مقدار المقاومة الحرارية لكائن حي معين في الغذاء إلى درجات حرارية مختلفة وعند رسم الخط البياني لذلك يمكن التنبؤ بمقدار المقاومة لدرجات حرارية أُخرى غير مرسومة في الخط البياني ومن هذا يتضح مقدار الاستفادة من هذه الخاصية في التعقيم على درجات حرارية عالية ووقت قصير (HTST أو UHT) والتي يعتبر التعليب الصحي (Aseptic canning) نموذجا حياً لذلك.

ومن المعلوم أن منحنى زمن الموت الحراري TDT curve يتأثر بالوسط الغذائي المختبري أو بمكونات الغذاء لما له تأثير مباشر وغير مباشر على درجة مقاومة الجراثيم (الأبواغ) للحرارة، فالمعلومات المتحصل عليها من غذاء لا يمكن تطبيقها على غذاء آخر وعليه يجري عمل منحنى لزمن الموت الحراري TDT curve في نفس الفداء المطلوب حساب زمن التعقيم الحراري له.

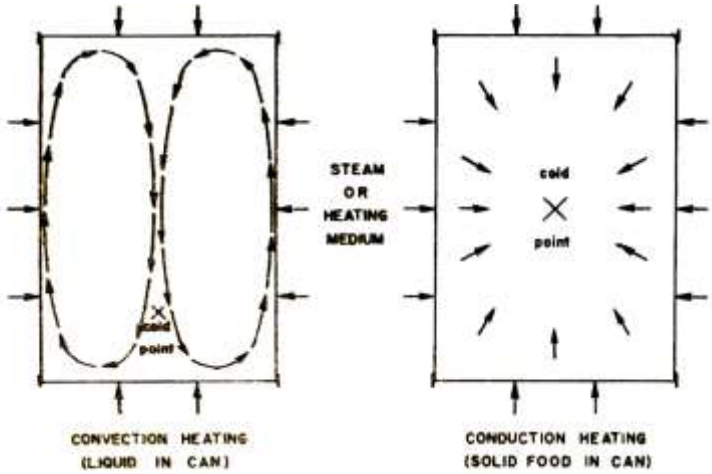
الانتقال الحراري للغذاء المعلب Heat penetration of Canned Food:

لا يكفي لتعقيم الغذاء المعلب أن نعرف الوقت (قيمة F) ودرجة الحرارة اللازمة للقضاء على الأحياء المجهرية من منحنى زمن الموت الحراري TDT curve أو أن نضع حدودا عليا للأمان باستعمال وقت بما يعادل 12 D بل لا نزال بعيدين عن الحصول على معاملة كافية لتعقيم الغذاء، فالمشكلة تتجسد في كيف نضمن أن جميع أجزاء الغذاء في العلبة قد استلمت معاملة حرارية كافية. ويتم ذلك فقط عندما نضمن الانتقال الحراري الكامل إلى جميع أجزاء العلبة وخاصة النقطة الباردة Cold Point منها من أجل اكتمال التعقيم وهذا يتطلب معرفة الوقت اللازم لانتقال الحرارة من خارج العلبة والى أبرد نقطة فيها وهذا الوقت يضاف إلى الوقت المتحصل عليه من منحنى زمن الموت الحراري TDT curve للحصول على وقت التعقيم.

تتوقف سرعة انتقال الحرارة من البخار الساخن إلى داخل العلبة ومن ثم إلى جميع أجزاء الغذاء على حجم العلبة ونوع الغذاء ودرجة توصيل الحرارة للمادة المكونة للعبوة نفسها حيث أن هذا سيحدد إذا ما كانت الحرارة متصل إلى منتصف العلبة بواسطة التوصيل أو الحمل. فانتقال الحرارة بالتوصيل يحدث في الأغذية الصلبة كاللحوم والأسماك ويتم في خط مستقيم وذلك عن طريق تماس الجزيئات بعضها مع البعض الآخر بينها النقل بالحمل بحيث في الحليب المبخر أو المركز أو عصير الفواكه والأغذية السائلة الأُخرى ويتم ذلك نتيجة لحركة الكتلة الغذائية المسخنة حيث يتأثر الجزء المسخن ويصبح اخف كثافة ثم يرتفع ليعمل دورة كاملة للكتلة الغذائية في داخل العلبة وهذا بدوره يساعد على ارتفاع درجة الحرارة بسرعة لجميع المحتويات ومن هذا يعتبر نقل الحرارة بواسطة الحمل أسرع من انتقالها بواسطة التوصيل.

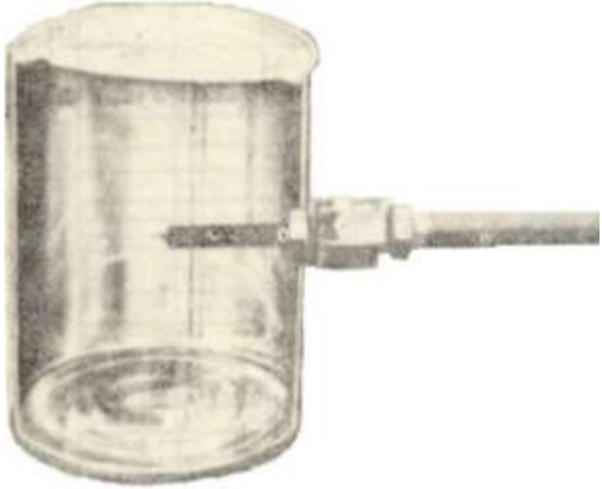
تعتبر النقطة الباردة Cold Point هي أخر نقطة في العلبة ترتفع حرارتها إلى درجة حرارة المعقم وان هذه النقطة تقع في منتصف العلبة في الأغذية ذات النقل الحراري بالتوصيل أما الأغذية ذات النقل الحراري بالحمل فتقع النقطة الباردة تحت مركز العلبة بكثير وقريباً إلى العقر. ومن أجل ضمان تعقيم العلبة يجب أن نعّرض النقطة الباردة لوقت كاف لتصل إلى درجة حرارة المعقم وان تبقى عند تلك الدرجة لوقت كاف لتحطيم الأبواغ المقاومة للحرارة. فإذا أعطينا وقت قدره 12 D وهو يساوي مثلا خمس دقائق على درجة 121.1°م فعليه يجب أن نضمن بان النقطة الباردة استلمت فعلاً خمس دقائق من التعقيم على رجة 121.1°م، فإذا ما حصل هذا فنحن على يقين بان جميع النقاط الأُخرى في الكتلة الغذائية قد استلمت نفس الكمية من الحرارة وان جميع الأبواغ في النقطة الباردة قد هلكت. ويتم قياس النقطة الباردة في العلبة بواسطة المزدوجة الحرارية (Thermo Couple) حيث تثبت في أي مكان جانبي من العلبة بشرط أن تكون نهايتها المدببة مؤشرة على منطقة النقطة الباردة، وطريقة العمل تتم بوضع المزدوجة الحرارية في العلبة

ثم تملى بالغذاء بعدها تفلق وتوضع في المعقم ثم يفتح البخار و نبدأ بتسجيل الارتفاع في درجة الحرارة عند منطقة النقطة الباردة مع مرور الوقت. فالوقت الكافي للتعقيم إذاً يتكون من الوقت المستغرق في نفاذ الحرارة إلى العلبة لصعود حرارة النقطة الباردة إلى حرارة المعقم إضافةً إلى وقت الـ 12 D الذي افترضنا أنه يساوي خمس دقائق على درجة 121.1°م، وفي حالة استخدام المعقمات التي تعمل بنظام الدفعات Batches نضيف إلى ما سبق وقت صعود المعقم والذي نعني به الوقت المستغرق من بداية فتح البخار في المعقم إلى حين وصول المعقم إلى درجة حرارة التعقيم النهائية.



الشكل رقم (175) يوضح موقع النقطة الباردة Cold Point في حالة انتقال الحرارة بالتوصيل والحمل، عن (Richardson, 2001).

الشكل التالي يوضح توصيل المزدوجة الحرارية Thermo Couple بإحدى العلب لقياس الوقت المستغرق في نفاذ الحرارة إلى العلبة لصعود حرارة النقطة الباردة إلى حرارة المعقم.



الشكل رقم (176) يوضح توصيل المزدوجة الحرارية **Thermo Couple** بعلبة تستخدم في تعليب الأغذية الصلبة والتي تنتقل الحرارة فيها بالتوصيل، عن (الحكيم ومهدي، 1985).

وهناك عدة طرق لمعرفة زمن المعاملة الحرارية ومنها نورد الطريقتين التاليتين:

1- طريقة الرسم البياني لمعرفة زمن المعاملة الحرارية

2- الطريقة العامة لحساب زمن المعاملة الحرارية

طريقة الرسم البيانى لمعرفة زمن المعاملة الحرارية:

فيما يلي موجز عن طريقة الرسم البياني:

1- يحدد الخط البياني لزمن الموت الحراري لمعظم الأحياء المجهرية المسببة للفساد ذات المقاومة الحرارية التي يحتمل وجودها في الغذاء المراد تعليبه بالاستفادة من معلومات انتقال الحرارة عند موقع النقطة الباردة Cold Point مع بيان وقت وسرعة هلاك الأحياء المجهرية عند كل درجة حرارية. ثم تحول أزمنة الموت الحراري لهذا الخط إلى معدلات مميتة Lethal rates عند مختلف درجات حرارة التسخين، حيث أن المعدل المميت لدرجة حرارة ما هو مقلوب زمن الموت الحراري، وعلى ذلك إذا احتاج الأمر إلى 12,4 دقيقة عند 120,3°م لقتل جميع الأبواغ في غذاء ما، فإن المعدل المميت هو $\frac{1}{12,4} = 0.0806$. كما يمكن أيضاً حساب المعدل المميت عند درجة حرارة T°ف، بمعرفة قيمة Z من المعادلة $10^{\frac{250-T}{Z}}$.

جدول رقم (31): المعلومات الأساسية لانتقال الحرارة عند موقع النقطة الباردة مع بيان وقت وسرعة هلاك الأحياء المجهرية والمعدلات المميتة لها عند كل درجة حرارية*

وقت التسخين	درجات الحرارة (°م)	قيمة (TDT)	مقلوب TDT	المعدل المميت
بداية التسخين	27,8	--	--	--
2	102,8	670	670 / 1	0,0015
4	110,0	129	129 / 1	0,0078
6	111,7	88	88 / 1	0,0114
11	113,9	53	53 / 1	0,0189
14	115,6	36	36 / 1	0,0278
17	116,7	28	28 / 1	0,0357
20	118,3	19	19 / 1	0,0526
22	118,9	16,7	16,7 / 1	0,0599
24	119,4	14,8	14,8 / 1	0,0676
27	120,0	13	13 / 1	0,0769
30	120,3	12,4	12,4 / 1	0,0806
31	120,3	12,4	12,4 / 1	0,0806
بداية التبريد				
32,5	119,4	14,8	1 / 14,8	0,0676
34	117,0	19,7	19,7 / 1	0,0507
38	102,8	670	1 / 670	0,0015

2- يحدد الخط البياني للنفاذ الحراري (والتبريد) للغذاء وحجم العلبة. وترسم المعدلات المميتة لمختلف درجات الحرارة عند موقع النقطة الباردة طوال عملية التسخين والتبريد على منحنى النفاذ الحراري (والتبريد) كما هو موضح في الشكل التالي رقم (145)، وفي هذا الشكل تكون المعدلات المميتة 0.01 وحدة لكل مربع، والأزمنة 5 أو 10 دقائق لكل مربع. بعد ذلك تقاس المساحة الكلية تحت المنحنى بالسنتيمترات المربعة بواسطة جهاز مِقْياسُ السُّطوح Planimeter أو أن المساحة تقطع وتوزن وتقارن مع (وحدة صغيرة واحدة) مربع واحد من مربعات الشكل البياني و لنفرض أنها 1 سم^2 ثم نضرب أبعادها في سرعة هلاك ووقت التسخين للحصول على قيمة الهلاك (Lethality)، بعدها نضرب هذه القيمة بمجموع المساحة الكلية المقاسة تحت منحنى الهلاك، وحاصل الضرب يجب أن يكون وحدة هلاك واحده (Lethality Unit) تساوي (واحد).

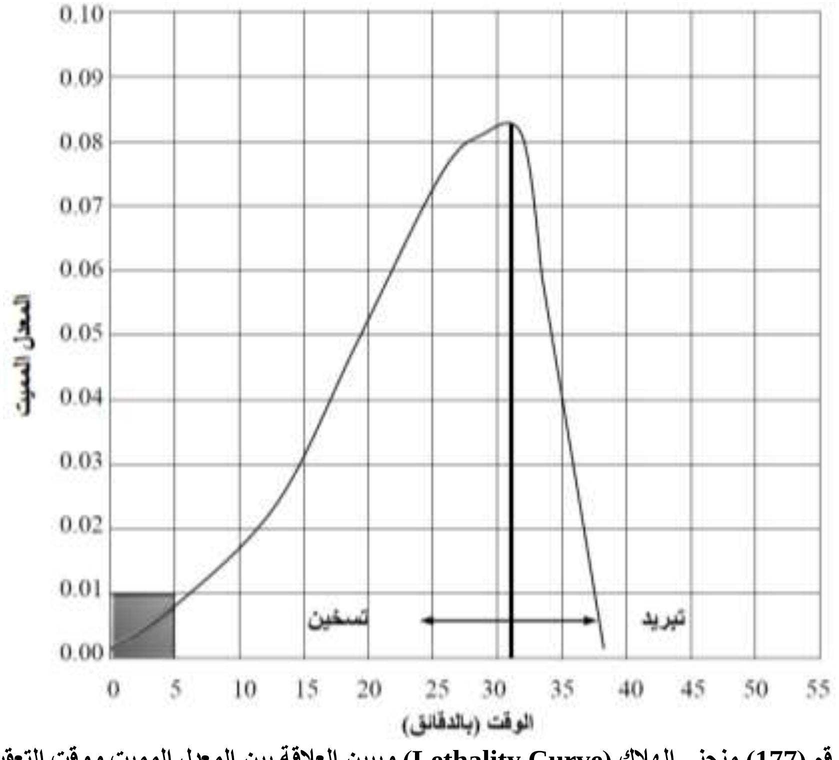
فإذا كانت أقل من واحد يزحف منحنى التبريد إلى اليمين ليعطي وحده هلاك تساوي واحد، وعلى العكس من ذلك إذا كانت النتيجة أكبر من واحد يزحف منحنى التبريد إلى اليسار ليعطي مساحة أقل تحت المنحنى وبالتالي يعطي وحده هلاك تساوي واحد.

على سبيل المثال إذا قمنا بقطع مربع واحد من مربعات الشكل البياني وكانت مساحته 1 سم^2 فإننا نقوم بضرب أبعاده الواحد بالأخر:

المعدل المميت × الوقت = قيمة الهلاك

إذن 0.01 × 5 = 0.05 (قيمة الهلاك)

ومن أجل الحصول على وحدة هلاك تساوي واحد سنحتاج إلى 20 سم^2 (1 ÷ 0.05) كمساحة كلية تحت منحنى الهلاك. فإذا كانت المساحة الكلية تحت المنحنى أقل من 20 سم^2 نحرك منحنى التبريد إلى اليمين ليعطي وحده هلاك تساوي واحد، و إذا كانت المساحة الكلية تحت المنحنى أكبر من 20 سم^2 نحرك منحنى التبريد إلى اليسار ليعطي مساحة كلية تحت منحنى الهلاك تساوي 20 سم^2.



الشكل رقم (177) منحنى الهلاك (Lethality Curve) ويبين العلاقة بين المعدل المميت ووقت التعقيم، عن (الحكيم ومهدي، 1985).

الطريقة العامة لحساب زمن المعاملة الحرارية:

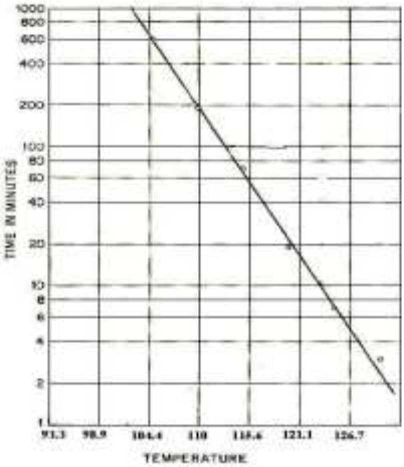
لحساب الزمن بالدقائق (t) اللازم لقتل عدد محدد من الأحياء المجهرية أو أبواغها في وعاء أو علبة معينة بواسطة المعاملة الحرارية عند درجة حرارة مقدارها (T)، عند معرفتنا لقيم Z و F (Z and F value)، نستعمل معادلة بول وولسون Ball & Olson (1957) وفيها تُحسب قيمة t من خلال المعادلة التالية: $t = F \times 10^{(250-T)/Z}$ والتي يأتي اشتقاقها استناداً إلى إن قيمة $t = 1$ دقيقة عندما تكون قيمة $F = 1$ دقيقة. وحيث أن المعدل المميت لدرجة حرارة ما هو إلا مقلوب زمن الموت الحراري، فإن قيمة $\frac{t}{F}$ = المعدل المميت (عندما تكون قيمة $F = 1$) وهنا تكون قيمة $\frac{t}{F} = 1$. وقد عرفنا سابقاً أن المعدل المميت عند درجة حرارة T (بمعرفة قيمة Z) أيضاً يمكن حسابه من المعادلة $10^{\frac{250-T}{Z}}$، وتكون قيمته ايضاً = 1 عند درجة حرارة 250°ف.

وبما أن قيمة $\frac{t}{F} = 1$، و $1 = 10^{(250-T)/Z}$ فــإن $\frac{t}{F} = 10^{(250-T)/Z}$.

إذن $\frac{250-T}{Z} = \log \frac{t}{F}$ وعليه فإن $\frac{t}{F} = antilog \frac{250-T}{Z}$.

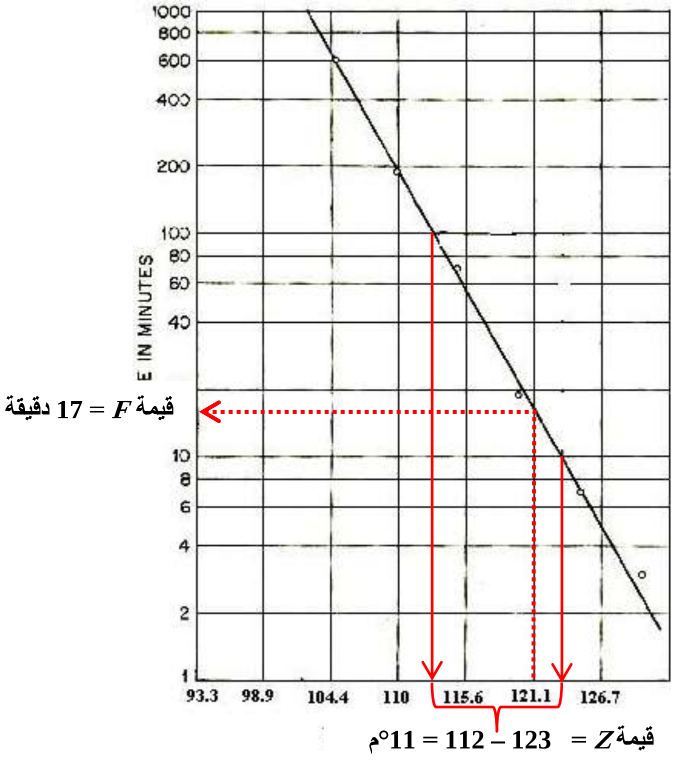
وبذلك يكون $t = F \times antilog \frac{250-T}{Z}$ أو $t = F \times 10^{(250-T)/Z}$

وقد يُخطى من يطبق أي من هذه المعادلات بأن لا يضع قيم F و Z المتحصل عليهما من منحنى TDT curve فتصبح النتيجة المُتحصل عليها غير صحيحة. أو قد تعطى له درجات الحرارة بالدرجات المئوية فهنا يجب عليه أن يستعيض عن قيمة 250°ف بقيمة 121,1°م وهنا تصبح المعادلات كالتالي: $t = F \times antilog \frac{121.1-T}{Z}$ أو $t = F \times 10^{(121.1-T)/Z}$



مثال: أحسب الزمن اللازم بالدقائق لقتل أبواغ الأحياء المجهرية في غذاء معلب بواسطة المعاملة الحرارية عند درجة حرارة مقدارها 120,5°م، (مع توضيح الخطوات التي اتبعتها بالتفصيل) مستعيناً بالبيانات المتحصل عليها من منحنى زمن الموت الحراري Thermal death time curve المرفق:

<u>خطوات الحل</u>: أولاً نقوم بتحديد قيم Z و F **(Z and F value)** من منحنى زمن الموت الحراري **Thermal death time curve** المرفق وذلك على النحو التالي:



إذن من خلال المعادلة $t = \times antilog \frac{121.1-T}{Z}$ يكون الحل كالتالي:

$$t = 17 \times antilog \frac{121.1 - 120.5}{11}$$

$$t = 17 \times antilog \frac{0.6}{11}$$

$$t = 17 \times antilog\, 0.054545$$

$$t = 17 \times 1.1338 = 19.3$$

أو من خلال المعادلة $t = \times 10^{(121.1-T)/Z}$ يكون الحل كالتالي:

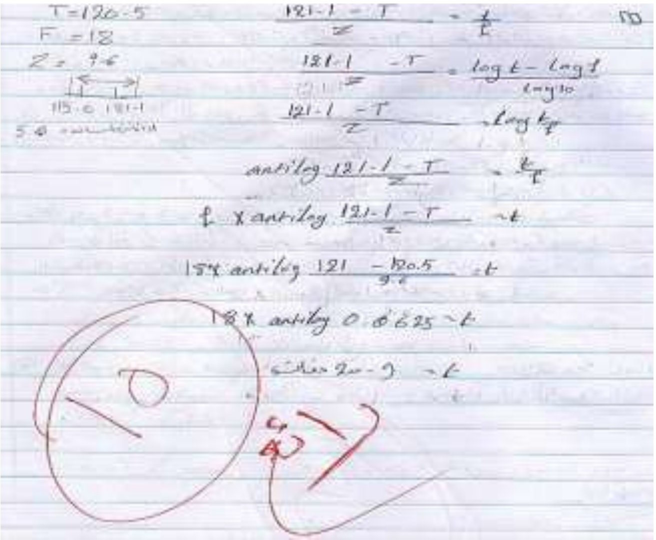
$$t = 17 \times 10^{(121.1-120.5)/11}$$

$$t = 17 \times 10^{(0.6)/11}$$

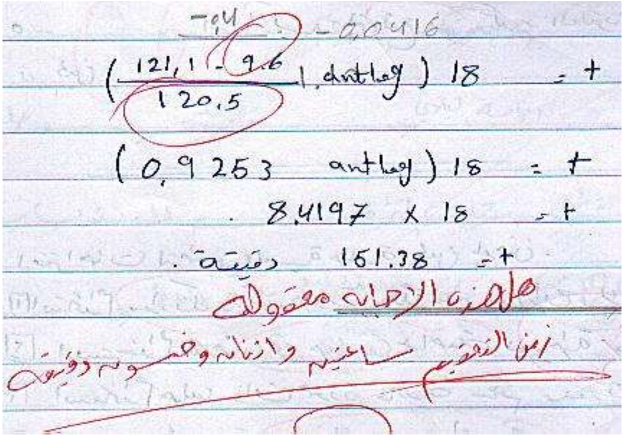
$$t = 17 \times 10^{0.054545}$$

$$t = 17 \times 1.1338 = 19.3$$

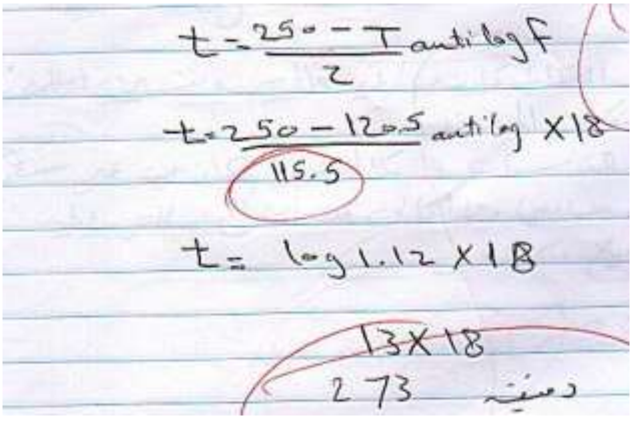
وفيما يلي أمثلة على إجابات بعض الطلبة وتوضيح لبعض الأخطاء التي ارتكبوها*، ونبدأ بإجابة نموذجية:



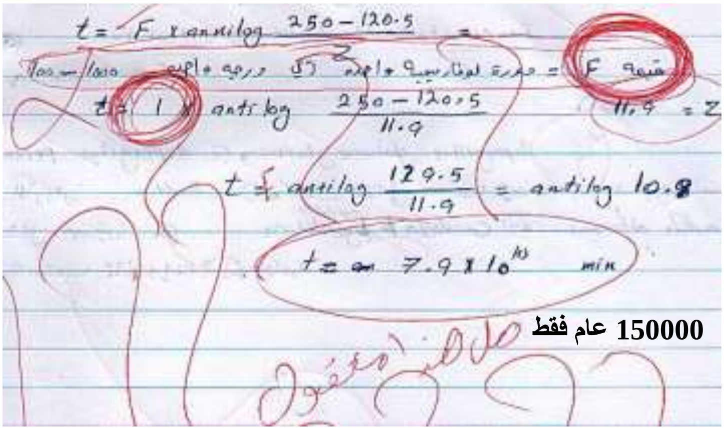
الطالب في الإجابة التالية أخطأ بوضع قيمة Z في المعادلة مكان قيمة T والعكس وكانت القيم الناتجة خاطئة:



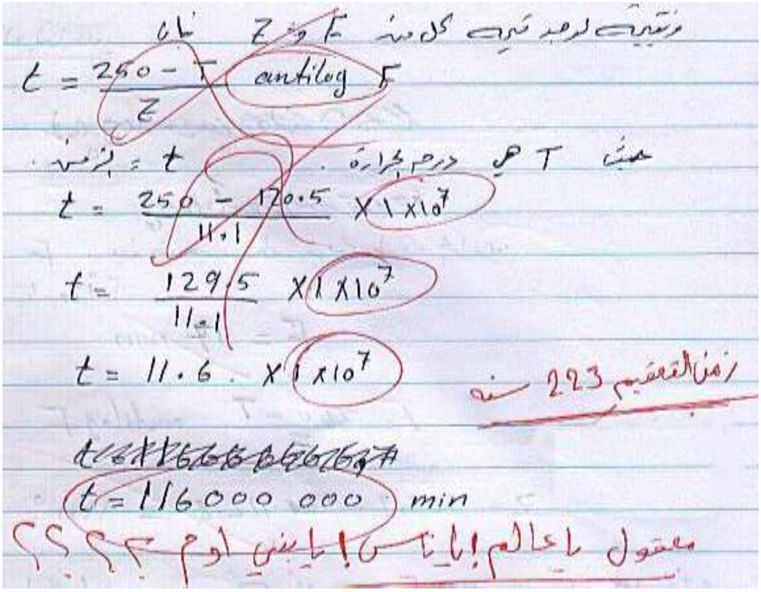
الطالب في الإجابة التالية لم يتمكن من حساب قيمة Z وكانت القيم الناتجة خاطئة وغير معقولة:



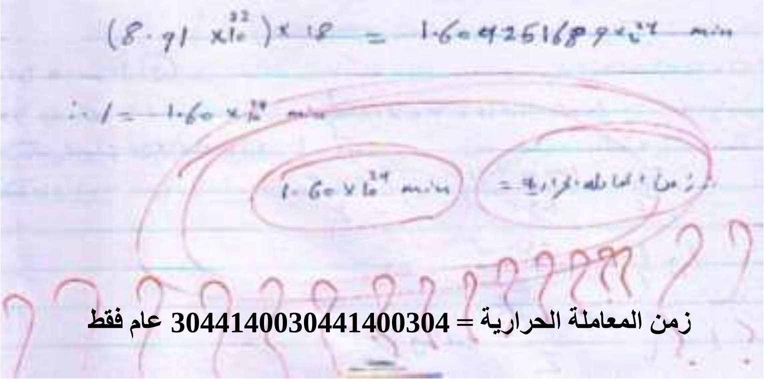
الطالب في الإجابة التالية لم يعرف أبداً كيف يحسب قيمة F وهذا ما حصل عليه:



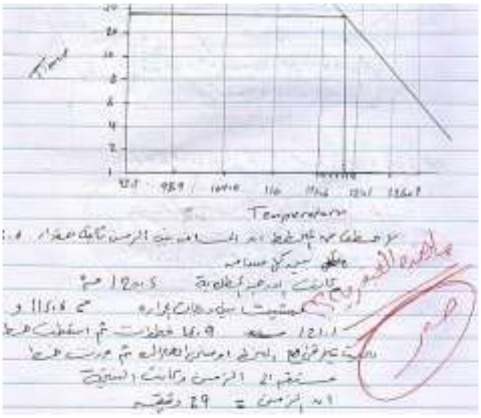
الطالب في الإجابة التالية أخطأ في طرح 120,5°م من 250°ف وليس من 121,1°م وهذا ما حصل عليه:

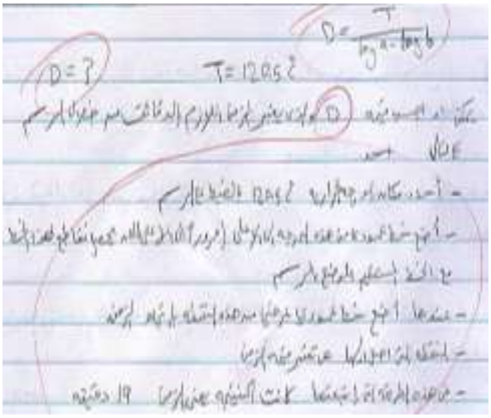


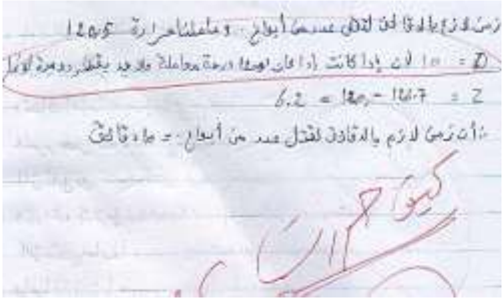
سأترك لكم التعليق على هذه الإجابة:

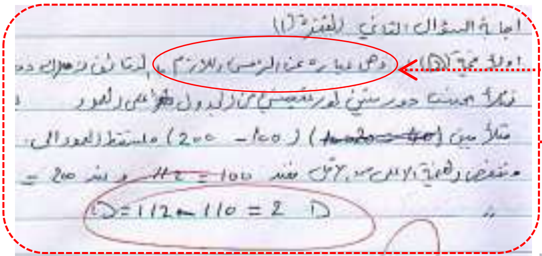


الإجابات التالية الطلبة لم يستوعبوا الشرح وقد قام بعضهم بالتخمين (أو الغش) وهذا ما حصلوا عليه:

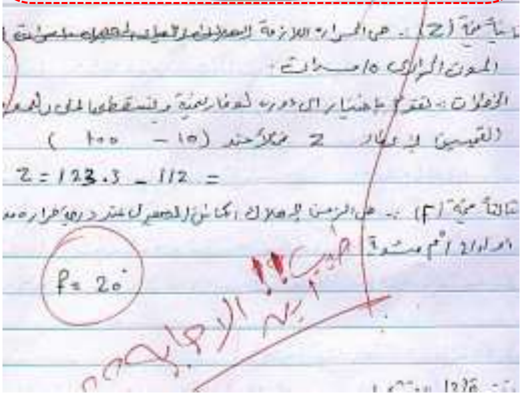








الطالب قام بحساب قيمة D بطريقة خاطئة (فهي وكما قال الزمن..الخ) ومع ذلك المحور X في المخطط لدرجات الحرارة وهنا وقع في الخطأ، علاوة على أن قيمة D لا تدخل في حساب قيمة *t*. ومع أنه قام بمحاولة حساب قيمة *Z* و *F* لكنه لم يستخدم المعادلة ولم يحاول اشتقاقها (فلم يحصل على الإجابة المطلوبة).



*** إن الغرض من هذه الأمثلة هو لتوضيح الأخطاء التي أُرتُكِبت لغرض تلافيها مستقبلاً.**

التأكد من صحة حسابات زمن المعاملة الحرارية:

عند حساب زمن المعاملة الحرارية بأي طريقة من الطرق المستخدمة ينبغي إجراء اختبار فعلي على الغذاء من خلال تلقيح الغذاء المعلب بـ (10000 بوغ) من أبواغ السلالة الاختبارية PA-3679 لكل علبة وغلق العلب ثم إجراء المعاملة الحرارية وفقاً لذلك الزمن المحسوب لعدد مناسب من العلب الملقحة بالسلالة الاختبارية مع عدد من العلب غير الملقحة والتي تعتبر علب مقارنة Control.

فمثلاً إذا أشارت الحسابات أن زمن المعاملة الحرارية المحسوب على درجة حرارة 115,6°م (مثلاً) هو 20 دقيقة، فعند ذلك يوضع العدد المناسب من العلب الملقحة بالسلالة الاختبارية مع عدد من علب المقارنة في المعقم ثم تعقم هذه العلب لفترات 17 و 18 و 19 و 20 و 21 و 22 و 23 دقيقة، وبعد اكتمال هذه المعاملات الحرارية يتم تخزين العلب عند درجة حرارة ملائمة لنمو الأحياء المجهرية المختبرة، ثم تفحص العلب (كما سبق توضيحه) وتسجل عدد العلب التالفة (التي حصل عندها نمو للأحياء المجهرية) عند كل زمن من الأزمنة التجريبية ثم بعد أربعة أسابيع يتم أخذ عينات من جميع العلب التي لم تُظهر أي علامات تلف وتفحص ميكروبيولوجياً باستخدام وسط زراعي مناسب للتأكد من وجود أو عدم وجود الأحياء المجهرية للسلالة الاختبارية، فإذا كانت الحسابات صحيحة والعمل الذي تم تنفيذه دقيقاً فإن العلب المعقمة لفترات 17 و 18 و 19 دقيقة ستُظهر تلف في حين أن العلب المعقمة لفترة 20 دقيقة لن تُظهر أي علامات تلف أو نمو للأحياء المجهرية وبذلك نكون قد تأكدنا بأن الزمن المناسب للمعاملة الحرارية هو 20 دقيقة أي أن الحسابات لزمن المعاملة الحرارية كانت صحيحة.

اختبار كفاءة التعقيم التجاري للأغذية المعلبة وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء بخصوص اختبار كفاءة التعقيم التجاري للأغذية المعلبة ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

المعلبات وخامات صناعة التعليب

الأغذية المعلبة التي عوملت بالحرارة في التعقيم التجاري يطبق عليها اختبار كفاءة التعقيم التجاري كما في المواصفة القياسية التي سوف تعتمدها الهيئة والخاصة بـ "الطرق الميكروبيولوجية الأغذية اختبار التعقيم التجاري" وذلك طبقاً للإجراءات التالية:

جدول رقم (32): اختبار كفاءة التعقيم التجاري للأغذية المعلبة وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية

الإجراء	الوصف	الحدود / للمل أو الغرام			
		ع	ق	م	ص
الإجراء الأول	يجب أن يكون عدد العلب المختبرة 24 علبة وعدم وجود عيوب قفل أو لحام أو انتفاخ خلال التحضين يدل على كفاءة عملية التعقيم التجاري وسلامة دفعة الإنتاج.	24	-	صفر	-
الإجراء الثاني	يجب عند وجود 1- 2 علبة بها عيوب أو انتفاخات بالتالي يجب فرز مجموعة أكبر من العلب من الدفعة ـ وفي حالة وجود أكثر من 1% من العلب بها عيوب ترفض الدفعة . أما وجود 1% فأقل يجري الإجراء الثالث.	-	%1	صفر	-
الإجراء الثالث	تفحص 24 علبة خلال فترة تحضين لمدة لا تقل عن 10 أيام في محضن عند 30 - 37°م. للمعلبات غير الحمضية أو في محضن عند 25°م للمعلبات الحمضية. يعتبر الإنتاج غير مطابق في حالة وجود علبة أو أكثر بها عيوب أو لحام أو انتفاخات بعد التحضين.	24	صفر	صفر	-
الإجراء الرابع	يجري عند عدم وجود أي انتفاخات أو عيوب قفل ولحام بعد الإجراء الثالث. وتفتح 10 علب ويفك اللحام الخاص بها وتفحص. تقبل الدفعة في حالة عدم وجود أي عيوب في اللحام أو القفل.	10	صفر	صفر	-

الفصل العاشر
ميكروبيولوجيا الحبوب والسكر وبعض الأغذية الأخرى
Cereals, Sugar & Miscellaneous Food Microbiology

تعتبر الحبوب Cereals من المحاصيل الرئيسة والمهمة في تغذية الإنسان، ويشكل القمح (إلى جانب الأرز) أحد محاصيل الحبوب الرئيسة في العالم والمستخدمة بشكل اساسي ويومي في تغذية الإنسان. وتحتوي اسطح الحبوب بعد حصادها على الفلورا الطبيعية التي كانت عليها إضافة إلى مصادر التلوث الأخرى بالأحياء المجهرية والمتمثلة بالتربةِ والأسمدة والطيور والحيوانات والحشرات وكذلك النباتاتِ الأخرى في الحقلِ وخصوصاً تلك التي قد تكون مصابة بممرضات النبات الفطرية والبكتيرية والتي قد يكون مصدرها البذور والتقاوي المصابة ومن ثم ستؤدي في النهاية لتَلويث الحبوبِ النامية ووجود هذه الأحياء المجهرية في المحصول النهائي. وتتراوح الحمولة الميكروبية الطبيعية على الحبوب بعد حصادها مباشرة من عدة آلاف إلى عدة ملايين من البكتيريا في الجرام الواحد وبضعة مئات الألوف من جراثيم الأعفان ونسبة أقل من الخمائر.

بعد حصاد محاصيل الحبوب لابد من تخزينها بطريقة جيدة وذلك للحفاظ على جودة الحبوب، حيث تعتمد جودة الحبوب بعد الحصاد على طريقة وأسلوب التحزين والوسيلة التي تستخدم للحفظ ومدى إمكانية التحكم في الظروف والعوامل المختلفة التي تتداخل مع الحبوب.

وهناك عدة طرق تستخدم لتحزين الحبوب مثل تخزين محاصيل الحبوب في سنابلها، أو التحزين فوق سطح الأرض (في العراء)، أو التحزين تحت سطح الأرض (المدافن)، أو التحزين في المخازن المُشيدة الخشبية أو الغرف الإسمنتية، لكن من أهم الطرق الحديثة التي يتم بها تخزين محاصيل الحبوب هي التخزين في صوامع الحبوب.

ويعتبر التخزين في الصوامع من أفضل طرق التخزين وأوفاها بالغرض، والصوامع في حد ذاتها لا تمنع إصابة الحبوب او استمرار التلف فيها اذا كانت قد خزنت و هي مصابة أو كانت الصوامع نفسها موبوءة و لم يتم تطهيرها، لكنها تمتاز بمنع عدوى الحبوب المخزونة بها من الخارج اذا كانت في الأصل سليمة، كما تمنع هجرة الحشرات إلى خارجها اذا كان المخزون بها مصاباً، ومن مميزاتها أيضا امكان خزن كميات كبيرة من الحبوب في اقل حيز ممكن، خاصة في الصوامع الكبيرة مع سهولة تدخينها بغازات التدخين (التَبْخِير) بنفقات زهيدة في أي وقت.

وقبل التخزين في الصوامع يجب فحص إذا كان هناك عفن بنقطة معينة من جدار الصومعة أو على محيط الأرضية، ويجب البحث عن وسيلة للتحكم في هذا العفن. لذا عند تجهيز الصومعة يجب ان تكون اسطحها الداخلية ناعمة ويجب أن تغطى جدران الصوامع المعدنية بطلاء حاوي

على صَمْغُ اللَّكّ Shellac وتدهن الاجزاء السفلية لها بطلاء البولي يوريثين Polyurethane قليل الاحتكاك. وفي حال الاسطح الخرسانية فأنها تنعم وتغطى بعدة اغطية من سليكات الصوديوم لأحكام اغلاق مساماتها.

وبشكل عام يؤدي التخزين السيء للحبوب ومنتجاتها إلى نمو الأحياء المجهرية والتي قد يتسبب بعضها في إفراز السموم الميكروبية وخصوصاً السموم الفطرية التي هي عبارة عن نواتج تمثيل ثانوية ناتجة من نشاط الفطريات الخيطية على الحبوب المخزونة. ويعتبر المحتوى المائي للحبوب إضافة إلى ودرجة حرارة تخزينها من أهم العوامل التي يتم من خلالها السيطرة على نمو وتواجد الأحياء المجهرية في الحبوب، فيجب عدم تخزين الحبوب في أماكن رطبة فأعداد الأحياء المجهرية تزداد بشكل أكبر في الحبوب ذات المحتوى المائي العالي وتتناقص في الحبوب الجافة بحيث لا يبقى منها سوى البكتيريا المتجرثمة والأعفان المحبة والمتحملة للجفاف.

وعادة ما تكون متوسط نسبة الرطوبة للحبوب عند الحصاد مرتفعة، فمثلاً تكون متوسط نسبة الرطوبة لحبوب الأرز عند الحصاد تتراوح بين 20 - 24 % حيث أنه عادة ما يتم حصاده قبل اكتمال نضجه وذلك لمنع تشققه في الحقل ولتلافي التكسير الحادث من التصادم الميكانيكي للحبوب اثناء الحصاد، وقد يتم حصاد الحبوب قبل إتمام نضجها أو بعد أيام ممطرة أو عالية الرطوبة، لذا من الضروري تخفيض هذه الرطوبة قبل التحزين حتى لا تتعرض الحبوب المحزنة للفساد أو التعفن. وبشكل عام، في حالة زيادة المحتوى المائي للحبوب عن 14 % يجب تجفيفها في الصَّوامِع. وهناك نوعان من أنظمة التجفيف هما:

<u>أولاً</u> - <u>خزانات التجفيف بالدفعات</u>: وفي هذا النظام توضع الحبوب في خزان ويدفع تيار من الهواء الساخن خلالها إلى أن تجف، ويتميز هذا النوع ببساطة إنشاءه وقلة تكاليفه كما يمكن استخدامه كوحدة تخزين. لكن يعاب على هذا النظام ما يلي:

أ- لا تصلح إلا للحبوب ذات الحجم الكبير والتي لها مقاومة كبيرة للإنضغاط والكسر حتى تحافظ على الفراغات البينية التي يمر بها الهواء .

ب- عدم انتظام توزيع الرطوبة فالحبوب التي بالقاع التي تقابل هواء ساخن يحدث لها جفاف أكثر من اللازم بعكس التي في القمة فتظل إما بدون تجفيف أو ربما يحدث لها ترطيب.

<u>وهناك عدة طرق لتلاشي هذه العيوب مثل:</u>

أ- التجفيف على مراحل يتخللها فترة راحة حيث يتم تشغيل المروحة والسخان معا فترة زمنية، يعقبها فترة زمنية يتم فيها إيقاف السخان وتشغيل المروحة فقط فيتم دفع هواء عادي خلال تلك الفترة لمعادلة الرطوبة ثم يتم تشغيل المروحة والسخان مرة أخرى.

ب- التجفيف عكس اتجاه سريان الهواء بالتبادل على فترات زمنية، ويتم ذلك بعمل تركيبات إضافية تسمح بتغيير اتجاه سريان الهواء من أسفل الخزان ثم إلى أعلى فترة ثم من أعلى إلى أسفل فترة أخرى.

جـ- تقليب الحبوب أثناء التجفيف، ويتم ذلك بإضافة جهاز تقليب على هيئة ناقل حلزوني يقوم بنقل الحبوب التي يتم تجفيفها من قاع الخزان إلى السطح العلوي ليحل محلها حبوب رطبة.

د- تجفيف طبقة صغيرة من الحبوب حيث يتم ملئ جزء آخر من خزان التجفيف إلى نفس العمق حيث يتم تجفيفه وتبريده ثم نقله إلى وحدة التخزين.

هـ- تجفيف طبقة صغيرة من الحبوب مع استخدام نظام التقليب إضافة إلى تغيير اتجاه سريان الهواء بدلا من الرأسي (أعلى إلى أسفل) ليكون أفقيا (من اليسار إلى اليمين).

و- عمل تعديل للمجفف بعمل حجرة تجميع للهواء على شكل مثلث في قلب الخزان حيث يسمح بمرور الهواء في جميع الاتجاهات.

ثانياً - مجففات الحبوب المستمرة: يستخدم هذا النوع بكثرة في المضارب والمطاحن والمزارع الكبيرة، وفيه تتحرك الحبوب من أعلى إلى أسفل بفعل الجاذبية الأرضية ويقابلها الهواء الساخن فتتم عملية التجفيف. وتقسم المجففات المستمرة حسب اتجاه الحبوب والهواء إلى:

أ- مجففات ذات سريان متعامد: وفيها تسرب الحبوب لأسفل في أنبوب معدني مثقب فيسمح بمرور الهواء في اتجاه أفقي متعامد على اتجاه حركة الحبوب، وهو الأكثر استخداما والأقل تكلفة ويعيبه أن الحبوب التي بجانب فتحات الهواء تكون جافة أكثر من اللازم بعكس التي تكون في الاتجاه الآخر فتكون ذات رطوبة عالية.

ب- المجففات ذات السريان المعكوس: يتم التجفيف فيها باستخدام خزانات تجفيف دائرية مزودة قاعدتها حلزونية للتفريغ ويدفع الهواء خلال القاعدة ذات الثقوب التي تحمل الحبوب ويمر خلالها ثم خلال الحبوب إلى أعلى، ويتم تغذية الحبوب من أعلى وتتحرك لأسفل بينما يتحرك الهواء عكس ذلك ويوصى ألا يزيد عمق طبقة الحبوب ذو السريان المعكوس عن 1 متر.

جـ- المجففات ذات السريان المتوازي: وفيه تتحرك كلا من الحبوب والهواء في نفس الاتجاه وتزال معظم الرطوبة فيه بسرعة في السنتيمترات العلوية وارتفاع المجفف 1 متر.

د- المجففات المختلطة السريان: وفي هذا النوع يتم عمل ترتيبات خاصة تسمح للهواء بالمرور في الاتجاه المتعامد وفي عكس سريان اتجاه الحبوب.

ويمكن التقليل من إمكانية نمو الأعفان وكذلك التقليل من خطر مهاجمة وتلف الحشرات عن طريق التجفيف الصحيح والتهوية والإدارة الجيدة للحبوب المحزنة، حيث يزداد نشاط الحشرات نتيجة زيادة المحتوى المائي في الحبوب المحزنة وينتج عن ذلك بيئة مفضلة لنمو الفطريات وزيادة تكاثر الحشرات.

العوامل المؤثرة على تخزين الحبوب:

تتأثر الحبوب أثناء تخزينها بعدة عوامل من أهمها:

1 - درجة حرارة التخزين.

2 - المحتوى المائي للحبوب.

3 - فطريات التخزين (الأعفان).

1 - درجة حرارة التخزين: تموت معظم الحبوب و يقف تنفسها إذا ارتفعت درجة حرارة التخزين عن 50°م ولكن يستمر نمو أنواع معينة من الأعفان والبكتيريا وتنفسها حتى 80°م، كما تؤثر الحرارة المرتفعة على الجلوتين، وينعكس ذلك على خصائص التجهيز الصناعي. ويزيد معدل تكاثر الحشرات بارتفاع درجة الحرارة (35 - 40°م) غير إن الحشرات لو تعرضت لهذه الدرجة لفترة طويلة فإنها تموت، كذلك تؤثر درجة الحرارة تحت المميتة على خصوبة الحشرات، وقد تنتج أفرادا عقيمة، وتختلف درجة تحمل الحشرات للحرارة المرتفعة، إذ تموت جميع أطوار الحشرات إذا عرضت لحرارة 66°م لمدة 4 دقائق، أو 60°م لمدة 10 دقائق، أو 49°م لمدة 20 دقيقة، أما درجات الحرارة اقل من 15°م فإنها تؤثر على تكاثر الحشرات وتطورها، وإذا طالت مدة تعريض الحشرة لدرجة 10°م تموت معظم الحشرات.

إن ارتفاع درجة حرارة الحبوب داخل المخزن فوق المعدل الذي تخزن عليه هو علامة على التدهور. وينشأ ارتفاع درجة الحرارة في الحبوب نتيجة احد عاملين هما:

أ. تنفس الحبوب. ب. الإصابة البكتيرية أو الحشرية أو الفطرية.

ويكون نشاط الحبوب مصحوبا بزيادة في إنتاج ثاني أكسيد الكربون، وزيادة تركيزه في أماكن التخزين يعد أيضا علامة من علامات تدهور الحبوب.

2 - المحتوى المائي للحبوب: تعتبر الرطوبة هي المفتاح الرئيسي للتخزين السليم إذ لا يحدث أي نشاط بيولوجي إلا في وجود الرطوبة، فإنبات البذور يحتاج لكمية كبيرة من الرطوبة (الماء). كما إن نمو البكتيريا والأعفان والحشرات تحتاج أيضا إلى درجات متفاوتة من الرطوبة. ورطوبة الحبوب نوعان: ماء يدخل في تركيب خلايا الحبة، وماء حر ينتشر على السطح، وهناك علاقة بسيطة بين المحتوى المائي للحبة وبين الرطوبة النسبية في الجو المحيط، ويحدث بين الاثنين حالة من الاتزان، فإذا كانت الرطوبة النسبية للهواء مرتفعة كثيرا فان الحبة تمتص الرطوبة من الجو، وإذا كان العكس فان الحبة تفقد نسبة من رطوبتها، ولكل نوع من الحبوب اتزان خاص. ولا يمكن القول بوجود درجة رطوبة مأمونة للحبوب من جهة التخزين، ولكن توجد درجات من الرطوبة يمكن إن تخزن عليها الحبوب دون حدوث أنواع معينة من التلف، وتتوقف هذه إلى حد كبير على درجة الحرارة، إذ كلما ارتفعت درجة الحرارة وجب إن ينخفض المحتوى المائي للحبة، وكي لا تتعرض الحبوب للتلف أو العطب إثناء التخزين يجب ألا تتجاوز رطوبة الحبة 12 % قبل التخزين.

العوامل التي تؤدي إلى ارتفاع المحتوى المائي للحبة:

1 - الحصاد قبل إتمام النضج أو بعد أيام ممطرة أو عالية الرطوبة.

2 - تعرض الحبوب لماء الندى أو المطر أو الضباب.

3 - النقل البحري للحبوب.

4 - نقل الحبوب من منطقة جافة إلى أخرى رطبة.

5 - عدم تجانس الحبوب كأن تكون خليطا من أنواع مبكرة و أخرى متأخرة النضج.

6 - وجود كثير من الحشائش مع الحبوب.

ويؤدي ارتفاع رطوبة الحبوب إلى انخفاض الوزن النوعي للحبوب (وقد أصبح الآن التعامل على أساس الوزن النوعي بعد حسم زيادة في رطوبة الحبة هو القاعدة الأساسية لتداول الحبوب بين الدول)، كما يؤدي ارتفاع رطوبة الحبوب أيضا إلى انخفاض ناتج الطحن. وقد يؤدي تخزين الحبوب ذات الرطوبة العالية إلى ارتفاع مفاجئ في درجة الحرارة قد لا تتحمله اليد (62°م) وهو ما يعرف بظاهرة سخونة الحبوب الرطبة، ويحتمل إن تنبت الحبوب على سطح الكومة وتتعفن ويغمق لونها، وتكتسب رائحة كريهة وترتفع نسبة الحموضة في الدقيق الناتج عنها.

وتحدث ظاهرة سخونة الحبوب **Grain Heating** بشكل عام في الحبوب ذات المحتوى المائي العالي أو الحبوب الجافة، لكنها في الحبوب ذات المحتوى المائي العالي (الحبوب الرطبة) تكون إما بسبب عمليات التأكسد الناتجة عن تنفس الحبوب إذ إن أي عامل ينشط تنفس الحبوب يزيد من درجة حرارتها، وأول هذه العوامل ارتفاع المحتوى المائي للحبة. و إذا بدأت الحرارة في الارتفاع و لو لدرجة بسيطة فإنها لا تقف وإنما تأخذ في الزيادة، لان ارتفاع الحرارة نفسه يزيد التنفس. أو بسبب وجود كائنات حية دقيقة على السطح الخارجي للحبوب وتحت قشرتها عند الحصاد. وارتفاع المحتوى المائي للحبة قبل التخزين أو تعرضها لعوامل تزيد من نسبة الرطوبة أثناء التخزين تسبب نمو الجراثيم الساكنة و نشاطها مما يسبب ارتفاع في درجة حرارة الحبوب. وتفرز الأعفان أثناء نموها على الحبوب إنزيمات عديدة تؤثر على محتويات الحبة الكربوهيدراتية والبروتينية والدهنية، وتسبب ارتفاع الحموضة، وتقلل نسبة الإنبات، وتسبب لون ورائحة غير مرغوب فيهما في الحبوب. ويبدأ ارتفاع الحرارة عادة في مناطق صغيرة من كتلة الحبوب تعرف بالجيوب **Pockets** ترتفع فيها المحتويات المائية لأي سبب من الأسباب السابقة، ويتحرك الهواء الساخن من وسط كتلة الحبوب ويتكثف عند تعرضه للهواء البارد مما يزيد من المحتوى المائي للمنطقة المحيطة بالجيب، وترتفع درجة حرارة المنطقة وتستمر الحرارة بالانتشار حتى تعم كومة الحبوب كلها.

وتتميز ظاهرة سخونة الحبوب الرطبة بما يلي:

1 - لا تحدث إلا في الحبوب ذات المحتوى المائي العالي (تصل إلى 17 - 18 %).

2 - ترتفع درجة حرارة الحبوب عن 42°م وقد تصل إلى 63°م.

3 - قد توجد أو لا توجد حشرات حية في الحبوب.

أما ظاهرة سخونة الحبوب الجافة فتكون اقل خطورة من سابقتها، وتحدث في مناطق صغيرة، وقلما إن تنتشر إلى باقي الحبوب، ويكون الارتفاع مفاجئا و سريعا مثل الحالة الأولى، ولكن تكون درجة الحرارة محتملة، ويعزى ارتفاع الحرارة في هذه الحالة إلى تنفس الحشرات و تعالج هذه الحالة بالتهوية والقضاء على الحشرات.

وتتميز ظاهرة سخونة الحبوب الجافة بما يلي:

1 - تحدث في الحبوب ذات الرطوبة المنخفضة نسبيا (11,5 % ولا تزيد عن 15 %).

2 - تصل درجة حرارة الحبوب إلى 38°م ولا تتعدى 42°م.

3 - توجد حشرات حية كثيرة مع الحبوب.

3 - فطريات التخزين Storage Fungi: وهي الفطريات التي تنمو على الحبوب والمنتجات المخزونة، ومعظمها له القدرة على النمو في غياب الماء الحر، وقد تم حصر 85 نوعاً من فطريات التخزين من حبوب القمح والشعير والذرة الرفيعة والذرة تتبع الأجناس الآتية:

Curvularia, Alternaria, Mucor, Fusarium, Rhizopus, Penicillium, Aspergillus.

ولا توجد هناك إحصائية دقيقة عن الفقد العالمي في الحبوب الغذائية نتيجة لفطريات التخزين، ولكن طبقا لتقديرات الفاو عام 1973 يبلغ هذا الفقد 5 % على اقل تقدير، وقد يصل هذا الفقد في بعض البلاد كالهند وبعض الدول الأفريقية إلى 30 % من المحصول السنوي.

وقد تبين إن فطريات التخزين تصل إلى معدلات كبيرة في الحبوب ذات المحتوى المائي العالي، وهي لا تصيب عادة قبل الحصاد ولكنها قد توجد على البذور بأعداد قليلة، وقد توجد كميسليوم ساكن داخل أنسجة قصيرة الحبة.

مراحل تطور الأحياء المجهرية في الحبوب المخزنة:

- المرحلة الأولى: تكون السيادة فيها لفطريات الحقل من الأجناس *Fusarium, Alternaria* و *Cladosporium*.

- المرحلة الثانية: ينخفض فيها تعداد فطريات الحقل.

- المرحلة الثالثة: تحل الخمائر محل فطريات الحقل، وقد تصحب بالفطر *Penicillium*.

- المرحلة الرابعة: تظهر فطريات التخزين.

- المرحلة الخامسة: مع سخونة الحبوب الذاتية تزدهر الكائنات الحية التي تتحمل الحرارة (30°م - 60°م) وتزداد سيطرة فطريات التخزين مع ارتفاع حرارة الحبوب وطول مدة التخزين.

العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية في الحبوب المخزنة:

أ- المحتوى المائي للحبوب.

ب- درجة حرارة التخزين.

ج- الضرر الميكانيكي للحبوب نتيجة إصابتها بالحشرات والقوارض.

مكافحة آفات الحبوب المخزونة:

تتعرض الحبوب المخزونة لخسائر كبيرة نتيجة إصابتها بالحشرات والقوارض، وحتى ان جفاف الحبوب بهدف الحيلولة دون حدوث تدهور لها بفعل الفطريات لا يحمي تلك الحبوب من الإصابة الحشرية، وعلى هذا تعتبر مكافحة الآفات الحشرية والوقاية منها بشتى الطرق أمراً مهماً وضرورياً لتقليل الفقد في الحبوب المخزونة الى اقل قدر ممكن، وتنقسم طرق مكافحة آفات المخازن الى طريقتين رئيستين (وقائية وعلاجية).

أولاً - الإجراءات الوقائية: تهدف الى منع او تقليل إمكانية حدوث إصابة وتشمل:

أ. **إجراءات حقلية:** وفيها تراعى الاحتياطيات الآتية:

1 - حصاد المحصول بعد تمام نضجه وتحاشي تركه مدة طويلة في الحقل بعد نضجه او بين حصاده وتخزينه، لكي لا يتعرض لبعض الحشرات التي تصيبه وهو في الحقل.

2 - التخلص من بقايا المحصول ومخلفاته في الحقل، وتنظيف آلات الدراس والتذرية والغربلة.

3 - التأكد من نظافة وسائل النقل من أي إصابة او تطهيرها قبل و بعد استعمالها.

ب. **تطهير أماكن التخزين:**

1 - ترميم المبنى بحيث لا تترك فجوات او شقوق يمكن ان تأوي إليها الحشرات والقوارض.

2 - تطهر المخازن من مخلفات المحصول السابق المبعثرة على الأرض، أو العالقة بالسقف والجدران وما يمكن ان تحتويه من إصابة باستخدام مكانس الشفط الكهربائية.

3 - يتم رش المخزن بالمبيدات مثل البيرينون **Pyrenone** الذي ليس له أثر متبقي، كما يمكن أيضاً أيضا استخدام الايروسولات او مولدات الدخان، وفي حالة أن المخزن سيترك لفترات طويلة قبل استخدامه في عمليات التخزين فيمكن رش هذا المخزن بالملاثيون او اللندين، ويفضل استعمالهما في صورة معلقات حتى تترك غشاء من المبيد على الجداران بعد جفافها.

ج. **التأكد من نظافة الحبوب وجفافها:** فلا ينصح بتخزين الحبوب بدرجة رطوبة تزيد على 12 %، ويجب التأكد من نظافة الحبوب، وخلوها من الكسر والشوائب.

د. **خزن الحبوب بأغلفتها:** خزن الذرة الشامية بأغلفتها يحمي الحبوب من الإصابة بفراش الحبوب اذا كانت الكيزان مغطاة تماما بالأغلفة، ولكنها لا تحمي المحصول من الطيور والقوارض.

هـ. **الفحص الدوري للحبوب:** يعتبر الفحص الدوري للحبوب (كل أسبوعين او كل شهر على الأقل) أمراً ذا أهمية، حتى لا تتطور الإصابة و يصعب علاجها.

ثانياً - الإجراءات العلاجية: التي تهدف إلى التخلص من الإصابة الحشرية في حالة حدوثها، وتشمل:

أ. المكافحة الميكانيكية: وتتمثل في:

1 - الغربلة: وهي الطريقة يتبعها صغار المزارع والتجار، وتعمل الغربلة على فصل الحشرات الموجودة خارج الحبوب، وعلى فصل بعض الشوائب وكسر الحبوب، لكنها لا تفصل الأطوار الحشرية التي توجد داخل الحبة (كثير من اليرقات و العذارى) او التي تلتصق بها (بيض خنافس البقول) ويجب التخلص من نواتج الغربلة وإعدامها، ويلجأ إلى نخل الدقيق للغرض نفسه مع تكرار العملية عدة مرات لفصل اليرقات التي تظهر أسبوعيا بعد فقس البيض.

2 - استخدام القوة الطاردة المركزية: يستخدم جهاز خاص يُدعى **Entoleter** للقضاء على الحشرات الموجودة في الدقيق وأطوارها بفصلها بخاصية الطرد المركزي، والجهاز شائع الاستعمال في مطاحن الدقيق الحديثة.

ب. المكافحة الطبيعية: وتتمثل في:

1 - الحرارة (التبريد والتسخين): لكل حشرة منطقة حرارية تكون فيها في أقصى نشاطها، وارتفاع درجة الحرارة او انخفاضها عن هذه المنطقة تدخل الحشرة في منطقة خمول يقل او يكاد ينعدم فيها نشاطها، فإذا استمر ارتفاع درجة الحرارة او انخفاضها عن ذلك تؤدي إلى موت الحشرات، واستخدمت هذه الظاهرة كوسيلة لمكافحة آفات المخازن بالتبريد أو التسخين. ويكون التبريد بامرار تيار هواء بارد في مكان تخزين الحبوب لإيقاف نشاط الحشرات. أما التسخين فيكون عن طريق امرار تيار هواء ساخن لوقف نشاط الحشرات او قتلها، وتعريض الحشرات لدرجة حرارة 60°م لمدة 10 - 12 ساعة يؤدي الى قتل جميع الحشرات وأطوارها، كما ان تعريض الحبوب لدرجات حرارة عالية لتحميصها يميت ما بداخلها من حشرات، لكنه يؤثر على حيوية الحبوب وعلى بعض خواص التجهيز الصناعي.

2 - الأشعة: استخدمت أشعة جاما (كوبلت 60) بنجاح في تعقيم حشرات المخازن، وكانت التأثيرات الجانبية للأشعة على الحبوب ضئيلة للغاية.

3 - الكهرباء: وتستخدم على نطاق ضيق لارتفاع تكاليفها، وتتلخص الطريقة في امرار الحبوب على حزام ناقل وسط مجال كهربائي ذي ذبذبة عالية للقضاء على جميع أطوار الحشرات داخل الحبوب وخارجها.

4 - المخازن ذات الجو المحكم: هنا يقضي على الحشرات بعد نفاذ كمية الأكسجين بالجو الداخلي وارتفاع تركيز ثاني أكسيد الكربون (القاتل للحشرات) وقد وجد ان سوسة الأرز تموت خلال فترة تقل عن 12 يوما في جو يحتوي على نسبة من ثاني أكسيد الكربون تتراوح ما بين 14 - 22 % في الوقت الذي تبلغ فيه نسبة الأكسجين في الجو 13,8 %.

ج. المكافحة الكيميائية: في المكافحة الكيميائية لآفات المخازن تستعمل المبيدات الحشرية بطرق عديدة وبصور مختلفة، ومن المهم استعمال المبيد في الصورة الصحيحة، وبالآلة المناسبة، ويمكن تلخيص الصور التي تستخدم فيها المبيدات الحشرية لهذا الغرض بالآتي:

1 - المساحيق الفعالة المخففة: تكون جاهزة للاستعمال مباشرة ولا تحتاج الى تخفيف، يحتوي معظمها على 0,1 - 5 % مادة فعالة، والباقي مادة حاملة أو مخففة، ويراعى الاحتفاظ بها جافة حيث ان كفاءة المبيد تتدهور بارتفاع الرطوبة بالإضافة الى صعوبة تعفيره بانتظام، وتستخدم هذه المساحيق أما بالخلط المباشر مع الحبوب، أو تعفير السطوح الخارجية لأكياس الحبوب أو عبوات المواد الغذائية لمنع الإصابات الجديدة، أو التعفير حول كومة الحبوب او المادة الغذائية لمنع زحف الحشرات إليها.

2 - المساحيق القابلة للبلل: ويمكن استعمالها رشاً بعد تحويلها إلى معلقات تحتوي على 20 - 80 % من وزنها مادة فعالة تضاف إليها مواد مثبتة ومواد مبللة وأخرى لاصقة، وتستعمل عند معاملة المخازن (رش الجدران و الأسقف و الأرضيات)، وعند معاملة السطوح الخارجية لأكياس الحبوب، وكذلك عند تطهير وسائل نقل الحبوب. ولمنع ترسب المساحيق القابلة للبلل بعد الخلط تستعمل لرشها أداة رش مزودة بمقلب.

3 - المركزات القابلة للاستحلاب: تستحلب بتخفيفها بالماء وتستعمل للأغراض نفسها التي تستعمل لها المسحوقات القابلة للبلل إلا أن وجود المقلب في أداة الرش غير ضروري.

4 - الايروسولات والمضببات ومولدات الدخان: في الايروسول يخلط المبيد مع غاز الفريون، وتبقى جزيئات المبيد معلقة في الهواء فترة وتتأثر بحركة الهواء وتتخلل الشقوق والفجوات وتترسب ببطء، ولابد من استعمالها في حيز مغلق. أما في المضببات يخلط مع المبيد زيت معدني خفيف وعن طريق الآلات خاصة تخرج جزيئات المبيد بالهواء المضغوط او بإسقاط المبيد على اسطوانة سريعة الدوران او مع هواء ساخن او غازات عادم ساخن او بخار يحيل المبيد إلى جزيئات متناهية الصغر تشبه الضباب. أما مولدات الدخان فيخلط فيها المبيد مع مادة تولد الدخان بكثافة عند حرقها كالشموع والسكر أو خليط من السكر وكلورات البوتاسيوم، ولهذه الأدخنة خصائص الايروسولات نفسها.

5 - غازات التدخين (التَبْخِير Fumigants): وهي عبارة عن غازات او أبخرة تقتل الحشرات بعد وصولها إلى داخل جسم الحشرة عن طريق الجهاز التنفسي. ويعتبر التدخين الطريقة المثلي للقضاء على آفات الحبوب المخزونة.

يعتبر القمح من أهم الحبوب، وتتشمل الأحياء المجهرية الموجودة في القمح والدقيق الناتج منه على أبواغ بكتيريا *Bacillus* وخصوصاً *Bacillus subtilis* وكذلك بكتيريا القولون **Coliform** وبكتيريا *Lactobacillus* و *Leuconostoc* و *Micrococcus* و *Achromobacter* و *Flavobacterium* و *Serratia*. إضافة إلى جراثيم الأعفان *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Alternaria* و *Mucor* و *Rhizopus* و *Cladosporium*. أما بالنسبة للخمائر فإن أغلب المعزول من المناطق معتدلة الحرارة تمثلت في *Cryptococcus laurentii* و *C. albidus* و *Rhodotorula ingeniosa* و *R. glutinis*.

ورغم وجود هذه الأحياء المجهرية إلا أن دقيق القمح الذي لا تتجـــــاوز نسبة رطوبته 14 % نادراً ما يتلف، لكن عند ارتفاع نسبة الرطوبة يتعرض الدقيق للفساد والتلف حيث تنشط تلك الأحياء المجهرية وتتحول أبواغ بكتيريا *Bacillus* إلى خلايا خضرية ومن المعروف قدرتها على إفراز إنزيم الأميليز **Amylase** الذي يؤثر على خواص الدقيق، كما يحدث فيه تخمر لاكتيكي بفعل بكتيريا حامض اللاكتيك وتخمر كحولي بسبب الخمائر المتواجدة فيه، إضافة إلى نمو الأعفان مثل عفن *Rhizopus* الذي يظهر على شكل جراثيم سوداء في الدقيق، وقد تتمكن أعفان *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* من إفراز السموم الفطرية نتيجة لارتفاع نسبة الرطوبة وظروف التخزين السيئة.

وفي المقابل تؤثر العمليات التصنيعية للحبوب على محتوى الأحياء المجهرية، فعمليات التنظيف التي تتم للحبوب بهدف فصل الأتربة والقش وغير ذلك من الشَّوائب المختلطة بالحبوب وكذلك عملية تبييض الدَّقيق التي تتم بإضافة بعض المواد الكيميائية المؤكسدة مثل أكاسيد النيتروجين أو الكلور أو فوق اكسيد البنزويل بهدف زيادة بياض لون الدقيق تؤدي إلى اختزال أعداد الأحياء المجهرية.

<u>وهناك نوعان رئيسان من القمح هما:</u>

1- <u>القمح الصلب</u>: الذي يستخدم في إنتاج العجائن **Pasta** التي تدعى بمنتجات المَعْكَرُونَة (المَعْكَرُونَة القصيرة والاسباجيتي **Spaghetti** والشعرية **Macaroni products** والنودلز)، وتتم صناعة منتجات المَعْكَرُونَة في عدة خطوات تتمثل في استخدام دقيق القمح الصلب المسمى السميد أو السيمولينا **Semolina** والذي يتم عجنه وتشكيله (حسب المنتج المرغوب) ثم تأتي مرحلة التجفيف وفيها يتم التخلص من جزء من الماء من عجينة المَعْكَرُونَة بعد تشكيلها بحيث لا تجاوز نسبة الرطوبة فيها 12 % وذلك لمنع تلف هذه المنتجات، وأخيراً تأتي خطوة التبريد حيث يتم دفع الهواء البارد إلى حبيبات المَعْكَرُونَة لخفض درجة حرارتها التي اكتسبتها من عملية التجفيف لتـــخرج بدرجة حرارة مقاربة لدرجة حرارة

صالة الانـــتاج أو أقل، وتكسب عملية التبريد حبيبات المَعْكَرُونَة بريقاً و صلابة، وأخيراً تتم عملية التغليف. ونتيجة لتعرض منتجات المَعْكَرُونَة للحرارة أثناء التشكيل والتجفيف تنخفض أعداد الأحياء المجهرية فيها بشكل كبير، كما أن تجفيف هذه المنتجات إلى نسبة رطوبة لا تجاوز 12 % يمنع تلف هذه المنتجات. لكن أثناء صناعة منتجات المَعْكَرُونَة إذا لم تكن عملية التجفيف بالكفاءة المطلوبة أو تم نقل المَعْكَرُونَة التامة التجفيف (12 %) إلى جو رطب فإنها تمتص قدر من الرطوبة في طبقتها السطحية مما يؤدى الى تمددها وانفصالها عن الطبقة الداخلية لكن هذا النوع من التلف لا يُعد من أنواع التلف الميكروبي.

2- القمح الطري: الذي ينتج منه دقيق (طحين) القمح الذي يُعد المكون الأساس في صناعة الخبز الذي تكاد لا تخلو مائدة منه، وقبل طحن القمح لإنتاج الدقيق تتم عملية تكييف القمح ويقصد بها تَرْطيب القمح Humidification of Wheat من خلال معاملة حبوب القمح بالماء في درجات حرارة محددة وذلك بإضافة كمية من الماء إلى القمح (حيث تتراوح نسبة الرطوبة في حبوب القمح المخزن قبل التكييف بين 11,5 – 13 %) وفي هذه المرحلة المسماة الترطيب الاولي يتم رفع رطوبة القمح في صوامع الترطيب إلى حدود 13,5 – 14 % تم يترك ليستريح لفترة زمنية معينة، تليها فترة الترطيب الثانية التي تصل فيها رطوبة القمح إلى نسبة الرطوبة المثلى للطحن تكون في حدود 14,5 – 15 % تم يترك ليستريح لفترة زمنية أخرى حتى تصبح حبوب القمح في حالة مناسبة لعملية الطحن ثم تُجرى عملية الطحن والتي يتم الحرص فيها على الحصول على دقيق لا تتجاوز نسبة رطوبته 14 % (للأسباب التي ذُكرت سابقاً).

وهناك أنواع مختلفة من دقيق القمح منها الدقيق الكامل ويعرف بالدقيق الأسمر وهو ذلك الدقيق المحتوى على النُخالَة (نسبه الاستخلاص فيه تصل إلى 90 – 95 %) كما يحتوي أيضاً على كثير من الفيتامينات والعناصر المعدنية إضافة جنين القمح مما يعزز قيمته الغذائية (حيث أن حبة القمح الكاملة المستخرج منها تتكون من طبقة القشرة ثم طبقة النخالة ثم السويداء كما تحتوي على الجنين)، وهناك أيضاً الدقيق الأبيض وهو الدقيق الذى نزعت منه طبقات النُخالَة ونسبه الاستخلاص فيه 80 – 85 %، وهناك ايضاً الدقيق الأبيض عالي الاستخلاص أو ما يسمى بالدقيق الأبيض الفاخر (ويعرف محلياً باسم الطابونه) ونسبه الاستخلاص فيه 70 – 75 %، وللحصول على هذا الدقيق يتم التخلص من كلٍ من الجنين الذي يحتوي على معظم العناصر الغذائية في هذه الحبوب، كما يتم التخلص من طبقة النُخالَة التي تحتوي على الألياف الغذائية المهمة في التغذية وكذلك الكثير من الفيتامينات والعناصر المعدنية المتواجدة في هذه الطبقة.

<u>الفساد الميكروبي للخبز:</u>

تنتقل البكتيريا وأبواغها وكذلك جراثيم الأعفان والخمائر من دقيق القمح الى العجين المعد لصناعة الخبز، فعند اضافة الماء إلى الدقيق لعمل العجين تبدأ هذه الأحياء المجهرية بالنمو وقد تحدث (عند ترك العجين لفترة من الوقت) تخمرات لاكتيكية وكحولية وإنتاج غاز CO_2 مما يسبب تكون فقاعات داخل العجين، لكن درجة حرارة الفرن تقضي على كل الخلايا الخضرية للأحياء المجهرية المتواجدة في عجينة الخبز لكنها لا تستطيع القضاء على أبواغ بكتيريا، ولذلك يعتبر الخبز الطازج منتج شبه معقم بفعل للحرارة التي يتعرض لها أثناء عملية الخبيز، لكن قد يحدث تلوث للخبز بعد عملية الخبيز أثناء تداوله وتخزينه، ومن مصادر التلوث بالأحياء المجهرية المناضد والأسطح التي يوضع عليها بعد خروجه من الفرن وكذلك من الأشخاص العاملين في تداول وتغليف ونقل الخبز. ومن النقاط التي ينبغي مراعاتها أنه عند تغليف الخبز ينبغي أن تتم هذه العملية بعد تبريد الخبز بشكل جيد لأن تغليف الخبز وهو ساخن يؤدي إلى تكثف الرطوبة داخل هذه العبوات مما يؤدي إلى تشجيع نمو أبواغ البكتيريا التي قاومت حرارة الخبيز، كما أن الرطوبة المتكثفة تشجع نمو الأعفان التي قد يكون الخبز تلوث بها من المصادر المُشار إليها أعلاه.

ومن مظاهر الفساد الميكروبي في الخبز ما يلي:

1 – الخبز المطاطي **Elastic bread**، حيث يصبح الخبز لزج ومطاطي ويعود هذا النوع من الفساد إلى نمو أبواغ بكتيريا ***Bacillus*** التي قاومت حرارة الخبيز فتنتج مواد لزجة مطاطية بسبب التحلل المائي لبروتين الطحين المسمى جلُوتين **Gluten** وتكوين ببتيدات لزجة، كما تقوم بتحليل النشا بواسطة إنزيمات الأميليز **Amylases** الى سكريات تشجع تكوين المواد اللزجة التي تدخل في تركيب المحفظة الهلامية (الكبسولة **Capsules**) للبكتيريا، علاوة على ظهور رائحة غير مرغوبة للخبز.

2 – الخبز الحامضي **Sour bread**، وتحدث هذه الظاهرة نتيجة ترك العجين لفترة طويلة من الوقت مما يؤدي إلى نمو بكتيريا حامض اللاكتيك مما يؤدي إلى ارتفاع حموضة العجين وتكون عجينة حامضة **Sour dough** تؤدي إلى ظهور هذه الحموضة بشكل واضح في الخبز المنتج منها.

3 – الخبز الأحمر أو الدموي **Red or Bloody bread**، وهذه النوع من الفساد نادر الحدوث ويكون نتيجة تكون بقع حمراء ناتجة عن نمو بكتيريا ***Serratia marcescens*** والتي تنتج صبغة حمراء. كما قد تحدث هذه الظاهرة بسب خميرة ***Rhodotorula*** أو نتيجة نمو عفن ***Neurospora sitophila*** (***Monilia sitophila***) الذي ينمو على الخبز ويكسبه اللون البني إلى الأحمر.

4 – الخبز الطباشيري **Chalky bread**، وهو أيضاً من أنواع الفساد نادر الحدوث ويكون نتيجة نمو خمائر *Trichosporon* و *Endomycopsis* على الخبز.

5 – تعفن الخبز **Bread moldiness**، وهناك عدد من الأعفان التي تنمو على الخبز من أشهرها عفن الخبز الأسود *Rhizopus nigricans* (*R. stolonifer*) الذي يتسبب في ظهور نمو زغبي يكتسب اللون الابيض المنقط بالأسود في الخبز. أو ينمو عفن *Aspergillus niger* الذي يظهر على هيئة نمو اسود بشكل دبابيس ناعمة، كما قد ينمو عفن *N. sitophila* (كما أسلفنا) مما يكسب الخبز اللون البني إلى الأحمر، في حين أن عفن *Penicillium expansum* و *P. stoleniferum* يكون على هيئة نمو اخضر زيتوني، أما الأنواع التابعة لجنس *Mucor* فتظهر بشكل نمو زغبي ذو لون أبيض.

وقد لا يتسع المجال هنا للحديث عن كل منتجات الجبوب الأخرى (وخصوصاً أن بعضها قد تحتوي على مواد غذائية أخرى مثل اللحوم والبيض ومنتجات الألبان وغيرها) ولكن سيتم تلخيص أهم الأحياء المجهرية والفحوصات الميكروبيولوجية التي تُجرى عليه من خلال ما ورد في الحدود الميكروبيولوجية للحبوب ومنتجاتها وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية.

الحدود الميكروبيولوجية للحبوب ومنتجاتها وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء بخصوص الحبوب ومنتجاتها ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (33): الحدود الميكروبيولوجية للحبوب ومنتجاتها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
الحبوب الكاملة	Molds	5	2	10^2	10^5
دقيق الحبوب ـ الردة (النخالة) ـ المواد الناتجة الشبيهة	*Bacillus cereus* *Clostridium perfringens*	5 5	1 صفر	10^3 10^2	10^5 10^2
دقيق فول الصويا أو مركزات الصويا أو المستخلصات من فول الصويا	Molds *Salmonella* *Escherichia coli* *Bacillus cereus*	5 5 5 5	2 صفر صفر صفر	10^2 صفر 10 10	10^5 - - -
الكيك ومنتجات المخابز التي تؤكل مباشرة بدون تسخين	*Staphylococcus aureus* *Salmonella* *Escherichia coli* *Bacillus cereus*	5 20 5 5	1 صفر صفر صفر	10^2 صفر 10 10	10^4 - - -
البيتزا وفطائر اللحم والعجائن المجمدة المحشوة أو المغلفة	*Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 10	1 صفر	10^2 صفر	10^4 -
مقبلات (شوربة) تتركب من الأرز أو أنواع أخرى من الحبوب مع مواد أخرى.	*Bacillus cereus*	5	1	10^3	10^4
رقائق ومنتفخات الحبوب والبطاطس المقلية	Total Bacterial Count *Bacillus cereus* *Salmonella* *Clostridium perfringens*	5 5 5 5	1 1 صفر صفر	5×10^4 10^2 صفر صفر	10^5 10^5 صفر صفر
الخبز العادي	*Coliform* Count Molds and Yeasts	5 5	1 1	50 2×10^2	10^2 10^4
خبز محلى أو بالبيض أو بالحليب	*Coliform* Count Molds and Yeasts *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5 10	1 1 1 صفر	50 10^3 10 صفر	10^2 2×10^3 10^2 -
المكرونة ـ والشعيرية (جميع الأنواع الجافة)	Sulfate reducing Clostridia *Coliform* Count Molds and Yeasts *Salmonella* *Escherichia coli*	5 5 5 15 5	2 2 2 صفر صفر	20 10 10^2 صفر صفر	10^2 10^2 10^3 - -
نشأ	Total Bacterial Count Molds and Yeasts *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5 5	2 2 2 صفر	10^4 10^3 10 صفر	10^5 10^4 10^2 -
جاتوهات ـ تورتات ومنتجات المخابز الشبيهة لها مجمدة أو مجففة	Total Bacterial Count *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5 5	2 2 2 صفر	10^4 صفر 10 صفر	10^6 10 10^3 -
منقوع مستنبت الشعير	Total Bacterial Count Molds and Yeasts *Staphylococcus aureus* *Salmonella*	5 5 5 5	1 2 2 صفر	5×10^4 10^3 10^2 صفر	10^5 5×10^3 10^3 -

فساد السكر والأغذية السكرية Spoilage of Sugar and Sugary Food:

يعتبر كل من السكر والأغذية السكرية من الاغذية غير الملائمة لنمو العديد من الأحياء المجهرية حيث يستخدم السكر كمادة حافظة للعديد من المواد الغذائية، ويرجع التأثير الحافظ للسكر كونه يعمل على خفض رطوبة المادة الغذائية إلى الحد الذي تصبح معه الرطوبة المتبقية مرتبطة بالمواد الصلبة، فلا تستطيع الأحياء المجهرية أن تستفيد منها في نشاطها. ويضاف السكر للأغذية لإعطائها الطعم الحلو ويستخدم في صناعة الحلوى.

وينتج السكر من قصب السكر أو البنجر السكري حيث يتم الحصول على العصارة السكرية لكل من محصولي قصب السكر أو البنجر السكري (بطرق مختلفة تتناسب مع كل محصول)، ثم يضاف الجير (هيدروكسيد الكالسيوم) لهذا العصير لترسيب الشوائب منه، ثم يُستخدم ثاني أكسيد الكربون الذي يتفاعل مع الجير الزائد مما يؤدي إلى تشكل رواسب صلبة طينية يتم إزالتها من العصير السكري، وبعد ذلك يوضع العصير المُصفَّى في أجهزة تبخير ليتبخر معظم الماء ويُصبح العصير أكثر كثافة وحلاوة. ولتشكيل بلورات السكر يتم التخلص مما بقى من رطوبة في أجهزة تبخير تحت التفريغ، وعند تشكل بلورات سكر كبيرة الحجم في هذا العصير السكري المكثف يتم إجراء عملية طرد مركزي لفصل العصير المركز عن بلورات السكر وينتج بذلك السكر الخام الذي يكون لونه بني مصفر، ثم تتم عملية تكرير للسكر الخام البني بهدف الحصول على السكر الأبيض المكرر النقي وذلك بإذابة بلورات السكر في الماء ثم ترشيح المحلول خلال مرشحات ليصبح سائل صافي اللون بعدها يبخر هذا السائل حتى تتكون بلورات السكر مرة ثانية لكنها تكون هذه المرة بيضاء نقية، وتتم عملية طرد مركزي لينتج على إثرها السكر الأبيض المكرر النقي الذي يتم تجفيفه من أي رطوبة متبقية بعدها يعبأ السكر للتسويق.

لكن أثناء تلك المراحل تلك قد يحدث تكون مواد صمغية لزجة في العصير الخام نتيجة تواجد بعض الأحياء المجهرية في العصير الخام ومن أهم هذه الأحياء المجهرية بكتيريا ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*** والتي تكون مادة الدِكستران **Dextran** وبعض أنواع بكتيريا ***Bacillus*** التي تكون مادة الليفان **Levan** وهما من السكريات المتعددة التي تدخل في تكوين المواد الصمغية اللزجة التي تسبب عكارة ولزوجة العصير بحيث يصعب ترشيحه، وينتج عنه سكر ذو صفات غير جيدة من حيث اللون والرطوبة والنقاوة.

كما قد تتواجد عدد من البكتيريا الأخرى في العصير الخام المُعد لصناعة السكر مثل ***Enterobacter*** و ***Micrococcus*** و ***Achromobacter*** و ***Flavobacterium*** وخمائر مثل ***Saccharomyces*** و ***Zygosaccharomyces*** و ***Candida*** و ***Pichia*** وأعفان مثل ***Aspergillus*** و ***Cladosporium*** و ***Monilia*** وغيرها.

لكن بعد بلورة السكر وتنقيته وتعبئته لا يتبقى فيه إلا عدد قليل جداً من الأحياء المجهرية لا يتجاوز بضع مئات في الجرام الواحد من السكر أغلبها أبواغ بكتيرية لا يمكن أن تنبت وتتحول لخلايا خضرية لانعدام الرطوبة اللازمة لذلك. وهذه الأبواغ غالباً ما تكون تابعة للأنواع التالية *Bacillus stearothermophilus* و *Clostridium thermosaccharolyticum* و *Clostridium nigrificans* وكون السكر سيستخدم كمضاف للعديد من الأغذية وكذلك في عمل المحاليل السكرية للفواكه المعلبة...الخ، فقد وضعت مواصفات ميكروبيولوجية تحدد الأعداد المسموحة من هذه الأبواغ، وتنص على أنه بالنسبة للأعداد الكلية لأبواغ البكتيريا المحبة للحرارة العالية **Total Thermophilic Spores Count** فيجب أن لا تحتوي أية عينة من مجموع خمس عينات سكر أكثر من 150 بوغ من أبواغ البكتيريا المحبة للحرارة العالية لكل عشرة جرام من السكر، كما أن المعدل للخمس عينات لا يزيد عن 125 بوغ من أبواغ البكتيريا المحبة للحرارة العالية لكل عشرة جرام من السكر. أما بالنسبة لأبواغ بكتيريا الفساد الحامضي المسطح **Flat Sour** (*B. stearothermophilus*) فيجب أن لا تزيد عدد الأبواغ في أي عينة من خمس عينات عن 75 بوغ لكل عشرة جرام من السكر، ولا يزيد متوسط جميع العينات الخمس عن 50 بوغ لكل عشرة جرام من السكر، أما أبواغ البكتيريا اللاهوائية المحبة للحرارة العالية **Thermophilic Anaerobic Spores** (*C. thermosaccharolyticum*) فيجب أن لا تتواجد في أكثر من عينيتين من الخمس العينات المفحوصة (40 %)، كما يجب أن لا تتواجد أبواغ بكتيريا الفساد الكبريتي النتن **Sulfur stinker** (*C. nigrificans*) أيضاً في أكثر من عينيتين من خمس عينات مفحوصة، ولا يزيد عدد الأبواغ في أي عينة عن 5 أبواغ لكل عشرة جرام من السكر، كما يجب أن لا تحتوي أية عينة من مجموع خمس عينات سكر أكثر من 20 بوغ من أبواغ البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة لكل عشرة جرام من السكر، ولا يزيد العدد الكلي البكتيريا المحبة للحرارة المعتدلة عن 200 بكتيريا في عشرة جرام من السكر، ولا تزيد أعداد الأعفان والخمائر عن 10 أعفان و 10 خمائر لكل عشرة جرام من السكر.

العسل <u>Honey</u>:

على الرغم من أن العسل الطبيعي لا يتلف ولا يحتاج لحفظه أكثر من وضعه بوعاء محكم الغلق ويخزن بدرجة حرارة الغرفة، إلا أن الاهتمام بالعسل من الناحية الميكروبيولوجية بدأ في عام 1976م عندما اكتشفت أول حالة تسمم وشقي للرضع **Infant botulism** في الولايات المتحدة الأمريكية وكان سببها تناول العسل الملوث بأبواغ بكتيريا ***Clostridium botulinum***. والتسمم الوشقي للرضع هو مرض نادر الذي يُؤثِّرُ على الرضعِ الذين تقل أعمارهم عِن 12 شهر،

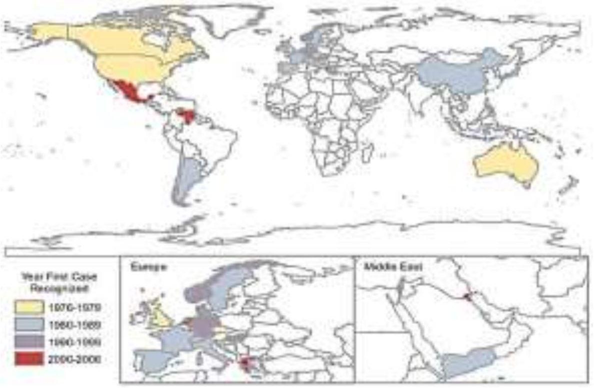
إن هذه البكتيريا عادة ما تكون غير ضارة للأطفال الأكبر سنا والبالغين حيث أن الفلورا المعوية تكون قادرة على منع نمو واستعمار بكتيريا ***C. botulinum*** في الأمعاء، كما أن مستوى عصارة المرارة (عند الأطفال الأكبر سنا والبالغين) يكون بالقدر الذي يمنع عادةً نمو أبواع هذه البكتيريا.

وفي حال ابتلاع ابواغ بكتيريا ***C. botulinum*** (سواء عن طريق العسل أو مصادر أخرى) تتمكن من النمو داخل أمعاء الأطفال الرضع وتكوين مستعمرات **Colonize** مما يؤدي إلى إفراز سمِّمها (في موضعه الاصلي **In situ**، أي في الأمعاء)، وهذا السم يتم امتصاصه عبر الجهاز الدوري ويتنقل إلى كل اجزاء الجسم مسبِّبًا شلل من خلال منع إفراز الأسيتيل كولين عند الموصل العصبي العضلي. وتشير بعض المراجع إلى أن ***C. baratii*** و ***C. butyricum*** يمكن أن تتسبب على نحو استثنائي أيضاً في إحداث حالة التسمم الوشقي للرضع.

أما الأعراض السريرية للتسمم الوشقي عند الرضع فتظهر على هيئة إمساك يحدث بعد فترة من التطور الطبيعي (وهو أول عَرَض للتسمم الوشقي عند الرضع لكن غالبًا ما يتم إهماله وعدم الانتباه له) يلي ذلك إعياء وصعوبة في الرضاعة نتيجة اضطرابات البلع مع سيلان اللعاب المفرط وبكاء متغير ومشاكل في التنفس، ثم تتطور هذه الأعراض غالبًا إلى شلل رخو تام. ويشخص التسمم الوشقي عند الرضع بظهور البكتيريا أو ابواغها أو السم في البراز. والتسمم الوشقي عند الرضع يمكن علاجه لكن من المهم الحصول على الرعاية الطبية في وقت مبكر من ظهور هذه الأعراض.

وحتى عام **2006**م وُثِقت **2943** حالة من حالات التسمم الوشقي للرضع في **26** بلد تنتمي لأربع قارات، شكلت الولايات المتحدة الأمريكية أعلى الدول التي سُجلت فيها هذه الحالات وقد بلغت عدد الحالات المسجلة فيها **2419** حالة، تلتها الأرجنتين بـ **410** حالة، ثم أستراليا **32** حالة.

ومن بين الدول العربية سُجلت أول حالة من حالات التسمم الوشقي للرضع في اليمن عام **1989**م (وأُشير إلى أن سبب هذه الحالة كان تناول العسل)، ثم في الكويت حديثاً في العام **2005**م. وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الشكل رقم (178) حالات التسمم الوشقي للرضع المُقر بها عالمياً للفترة بين 1976 - 2006م بحَسَب البلدان، عن (Koepke *et al.*, 2007).

وقد نشر مركز مكافحة الأمراض CDC في الولايات المتحدة في العام 1978م تقرير بعنوان **Honey exposure and infant botulism (Morbid., Mortal.)**، ثم كان من أوائل الأبحاث المنشورة عن عزل بكتيريا ***Clostridium botulinum*** من العسل البحث المنشور في مجلة **J. Clinical Microbiology** المجلد التاسع العدد الثاني عام 1979م بعنوان: **Isolation of *Clostridium botulinum* from Honey**. بعدها تولت الأبحاث التي تُشير إلى مسئولية العسل الملوث بأبواغ بكتيريا ***C. botulinum*** عن حالات التسمم الوشقي للرضع. وقد وجد أن القناة الهضمية للنحلة نفسها كانت المصدر لهذه الأبواغ، حيث تلتقطها مع الرحيق من الأزهار الملوثة كما يُحتمل أن يتم التلوث أيضاً خلال عمليات جمع وتعبئة العسل. وبالتالي يجب عدم إعطاء العسل أو الأطعمة المحتوية عليه لمن تقل أعمارهم عن 12 شهر.

ويحتوي العسل على تركيز عـــــالي من السكريات يصل إلى 82,3 % يشكل الفركتوز 34 – 41 % منها والجلوكوز 28 – 35 %؛ والسكروز 1 – 5 %، ونسبة الرطوبة فيه لا تجاوز 18 %، إلا أنه يتعرض للفساد وذلك عندما يحدث فيه تَبَلْوُرُ **Crystallization** للسكريات، ونتيجة لهذا التبلور يتحرر جزء من الماء المرتبط فيصبح متاح للأحياء المجهرية المحبة للضغوط الأسموزية العالية **Osmophilic** المتمثلة في الخمائر وخصوصاً الأنواع التابعة لجنس ***Zygosaccharomyces*** التي تتميز بقدرتها على النمو في التراكيز العالية من السكر، وتسبب فساد العسل والدبس والمحاليل السكرية المركزة والمولاس ومنها ***Z. nussbaumeri*** الذي عزل من عسل النحل وكذلك ***Z. mellis*** و ***Z. richten***.

<u>المربيات والهلام والمرملاد Jams, Jelly and Marmalade</u>:

سبق وأن عرفنا أن الفواكه تحفظ بإضافة السكر لإنتاج الفواكه المسكرة كما يمكن إنتاج المربيات والهلام (الجيلي) والمرملاد من لب الفاكهة والسكر مع إضافة كل من حامض الستريك والبكتين اعتماداً على نوع الفاكهة ودرجة نضجها، وذلك لتكوين الحالة الغروية، كما تتم إضافة شرائح الحمضيات (التي يجب أن تكون معلقة وموزعه بشكل جيد ومنتظم) في عند إنتاج المرملاد الذي هو مربى او هلام مشتمل على قطع وقشور الحمضيات. وقد عرفنا في فصل سابق أن فساد هذه المنتجات المعاملة حرارياً (100°م أو أقل) والمعبأة في عبوات زجاجية يكون عن طريق الأعفان والخمائر نتيجة للتركيز العالي من السكر فيها والذي يكون بحدود 68 % وكذلك الأس الهيدروجيني المنخفض (فهي من الأغذية الحامضية). وتتمكن الأعفان وعلى وجه الخصوص التي تمتلك جراثيم (سبورات) تقاوم درجات الحرارة العالية أو تُكون الأجسام الحجرية **Sclerotia** وعلى الأخص ***Byssochlamys fulva*** من النمو على سطح هذه المنتجات وخصوصاً بعد فتح العبوات، كما قد تتمكن الخمائر المحبة للضغط الأسموزي من النمو في حال عدم كفاءة المعاملة الحرارية أو تلوث العبوات بعد الفتح.

أغذية متنوعة أخرى Miscellaneous Food:

لن يتسع المجال هنا للحديث عن كل الأغذية التي لم يسبق ذكرها لكن سيتم تلخيص الحدود الميكروبيولوجية لهذه الأغذية المتنوعة Miscellaneous Food وأهم الأحياء المجهرية فيها والفحوصات الميكروبيولوجية التي تُجرى عليه من خلال ما ورد في المواصفات القياسية اليمنية.

الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء بخصوص بقية السلع والمواد الغذائية التي لم يسبق ذكرها في هذا الكتاب ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (34): الحدود الميكروبيولوجية لبعض السلع والمواد الغذائية التي لم يسبق ذكرها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
أنواع البسكويت الجافة السادة	*Coliform* Count	5	1	صفر	10^2
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7	5	صفر	صفر	-
بسكويت من الأنواع الجافة لها فترة حفظ طويلة ـ مغطاة بالشكولاتة أو بمادة أخرى أو محشوة	*Coliform* Count	5	2	10	10^2
	Salmonella	30	صفر	صفر	-
	Escherichia coli O157:H7	5	صفر	صفر	-
منتجات في صورة مساحيق سريعة الذوبان تحتاج إلى استرجاع قبل الاستهلاك	Total Bacterial Count	5	2	10^3	10^4
	Coliform Count	5	1	صفر	10^2
	Salmonella	60	صفر	صفر	-
	Staphylococcus aureus	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli* O157:H7	5	صفر	صفر	-

*اختياري

تابع جدول رقم (34): الحدود الميكروبيولوجية لبعض السلع والمواد الغذائية التي لم يسبق ذكرها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
منتجات في صورة مساحيق تحتاج إلى استرجاعها قبل الاستهلاك لحرارة حتى الغليان	Total Bacterial Count	5	3	10^4	10^5
	Coliform Count	5	2	صفر	10^2
	Salmonella	15	صفر	صفر	-
	*Clostridium perfringens**	10	1	صفر	صفر
	*Bacillus cereus**	10	1	صفر	5×10^1
منتجات معبأة في عبوات محكمة القفل ومعاملة بالحرارة	يجب أن تطابق الاشتراطات الميكروبيولوجية للمنتجات الغذائية المعلبة				
أغذية خاصة لمجموعة من المستهلكين على درجة عالية من الحساسية	Total Bacterial Count	5	1	10^3	10^4
	Escherichia coli	5	2	صفر	10
	Staphylococcus aureus	10	1	10	10^2
	Bacillus cereus	10	1	10^2	10^3
	Clostridium perfringens	10	1	10^2	10^3
	Salmonella	60	صفر	صفر	-
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli **O157:H7***	5	صفر	صفر	-
	Thermophilic *Campylobacter** **(25 grams)**	5	صفر	صفر	-
مرجرين	Molds and Yeasts	5	1	50	10^2
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
أنواع زبد المكسرات	*Salmonella*	10	صفر	صفر	-
المايونيز، المستردة، خلطة السلطة	Total Bacterial Count	5	1	10^3	10^5
	Coliform Count	5	1	10	10^2
	Molds and Yeasts	5	1	20	10^2
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
الخل	Total Bacterial Count	5	1	30	10^2
التوابل	*Staphylococcus aureus*	5	1	10^2	10^4
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Molds and Yeasts	5	2	10^2	10^4
	Faecal Coliform	5	2	10	10^3
شوكولاتة بأنواعها (سادة أو محلاة - بالحليب أو أحد مكوناته أو بالمكسرات محشوة أو مغلفة، أقراص أو أصابع، توفي، نوجة)	*Salmonella*	10	صفر	صفر	-
حلوى جافة أو الأنواع المجمدة - الكرامل - المنتجات الشبيهة بها	Total Bacterial Count	5	2	10^4	10^6
	Staphylococcus aureus	5	2	10	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
الكاكاو	Molds and Yeasts	5	2	10^2	10^4
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
جوز هند مبشور (مجفف)	*Coliform* Count	5	2	10^2	10^4
	Molds and Yeasts	5	2	10	10^2
	Salmonella	10	صفر	صفر	-

*اختياري

تابع جدول رقم (34): الحدود الميكروبيولوجية لبعض السلع والمواد الغذائية التي لم يسبق ذكرها

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
مكسرات	Molds	5	2	10^2	10^4
	Escherichia coli	5	2	صفر	10
العلك (اللبان)	Molds and Yeasts	5	1	5×10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
عسل النحل	Molds and Yeasts	5	1	10^2	10^3
المولاس بأنواعه، الدبس، كتل السكر البنية	Molds and Yeasts	5	1	5×10^2	10^3
	Escherichia coli	5	1	صفر	10
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
الجيلاتين	Total Bacterial Count	5	3	5×10^3	10^5
	Clostridium perfringens	5	1	10^2	10^4
	Staphylococcus aureus	5	1	10^2	10^4
	Salmonella	5	صفر	صفر	-

مواد غذائية تدخل كخامات في صناعة الأغذية المعلبة

دقيق - حليب - سكريات - بكتين - أحماض - حبوب - نشا - عجائن

نوع المنتج	الحدود / للمليلتر أو للغرام		
	م	ق	ص
يُجرى اختبار Thermophilic Bacterial Count لعدد 5 عينات زنة الوحدة 10 جرام، وتختبر الأنواع التالية:			
Aerobic Thermophilic Count	5	10/125 جرام	10/150 جرام
Flat Sour Bacteria	5	10/50 جرام	10/75 جرام
Thermophilic Anaerobes (Non H_2S gas producer)	5	3 Negative	-
Thermophilic Anaerobes (H_2S gas producer)	5	3 Negative	-

الفصل الحادي عشر

ميكروبيولوجيا مياه الشرب، المياه المعبأة والمياه الغازية

Drinking Water, Bottled Water and Carbonated Soft Drinks Microbiology

الماء H_2O عنصر ضروري له وظائف حيوية مهمة ومتعددة في جسم الإنسان كما أنه ضروري لإتمام جميع التفاعلات الكيميائية في الجسم، ويشكل نسبة كبيرة من تركيب الخلايا الحية. ويحصل الإنسان علي احتياجاته من الماء إما من المياه السطحية Surface Water والتي تشمل مياه الأنهار والبحيرات والجداول...الخ أو من المياه الجوفية Ground Water والمتمثلة بشكل أساس بمياه الآبار. وعادة تكون المياه السطحية عرضة للتلوث بجميع أنواعه، في حين أن المياه الجوفية اقل عرضة للتلوث. ويُعرف تلوث المياه بأنه أي تغيير يطرأ على الخواص الفيزيائية او الكيميائية او الميكروبيولوجية للمياه إلى درجـــة تحد من صلاحياتها للاستعمال المقصود. وأي كان مصدر المياه فلابد من تنقيتها قبل استخدامها للشرب أو التصنيع أو أي أغراض أخرى، حيث قد تحتوي المياه الخام على بعض الشوائب والملوثات مما يتطلب إجراء عمليات التنقية للمياه Water purification والتي تشمل المراحل التالية:

1 – إزالة المواد العالقة وذلك من خلال عملية الترسيب Sedimentation التي تؤدي إلى إزالة المواد العالقة كبيرة الحجم بفعل وزنها في أحواض ترسيب أما المواد العالقة الصغيرة جداً كالطين فيتم ترسيبها بعد إضافة مواد كيميائية مخثرة (كبريتات الألومنيوم) مما يؤدي إلى تجمعها على هيئة جسيمات أكبر حجماً يمكن ترسيبها بسهولة. ثم تتم عملية الترشيح Filtration التي يتم من خلالها امرار الماء خلال وسط مسامي مثل الرمل لإزالة ما تبقى من المواد العالقة التي لم تزال في أحواض الترسيب.

2 – إزالة المواد الذائبة المتمثلة في الغازات مثل H_2S و CO_2، وكذلك إزالة المواد العضوية المتطايرة وإزالة الحديد والمنجنيز وذلك بعملية التهوية Aeration (عن طريق ابراج تهوية او ضخ الهواء في المياه). وكذلك إزالة عسرة المياه التي تكون فيها نسبة الأملاح المعدنية (مثل Ca^{+2} و Mg^{+2} بالإضافة إلى بعض الأملاح الذائبة كالبيكربونات والكبريتات) عالية من خلال الترسيب الكيميائي Chemical precipitation بإضافة هيدروكسيد الكالسيوم $Ca(OH)_2$ أو كربونات الصوديوم Na_2CO_3، أو من خلال التبادل الأيوني بمبادلات تحتجز تلك الأملاح المعدنية. وهناك أيضاً عمليات تعمل أيضاً على إزالة المواد

الذائبة مثل الإدمصاص **Adsorption** باستخدام الكربون المُنشط **Activated carbon** الذي يعمل على إزالة المواد العضوية الذائبة التي تؤثر على لون ورائحة وطعم الماء، وكذلك عملية التناضح العكسي **Reverse Osmosis** التي تستخدم أساسا لإزالة الأملاح المعدنية كما تسهم في إزالة الفيروسات والبكتيريا وبعض المواد العضوية الذائبة.

3 – تعقيم المياه: لكي تصبح المياه صالحة لأغراض الشرب والاستعمالات المنزلية ولاستخدامها في الصناعات الغذائية فلابد من إبادة الأحياء المجهرية الممرضة المحتمل تواجدها فيها، وتنقسم طرق التعقيم إلى كيميائية يتم فيها استخدام مواد كيميائية كالكلور (أو أحد مركباته) والأوزون، وفيزيائية تتمثل في استخدام الحرارة أو الأشعة فوق البنفسجية.

أن الهدف من عمليات التنقية هو جعل المياه صالحة للاستخدام، وهنا ينبغي التأكد من كفاءة عمليات التنقية تلك من خلال اجراء الفحوصات الكيميائية والميكروبيولوجية للتحقق من صلاحيتها للاستخدام. وعلى الرغم من أن تقدير أعداد الأحياء المجهرية يُعد أحد الاختبارات التي تُجرى لمعرفة كفاءة عمليات تنقية المياه إلا أنه لا يمكن الحكم على صلاحية المياه الخام من الناحية الميكروبيولوجية من خلال فقط تقدير أعداد الأحياء المجهرية فيها، فكما عرفنا أن المياه السطحية تكون عرضة للتلوث بعكس المياه الجوفية التي تكون اقل عرضة للتلوث وبالتالي فقلة أعداد الأحياء المجهرية لا يعكس صلاحية تلك المياه للاستهلاك فقد تكون في هذه الأعداد القليلة بعض الأحياء المجهرية الممرضة التي تسبب خطر على الصحة العامة. وبالتالي لكي نقول أن الماء صالح للاستهلاك (من الناحية الميكروبيولوجية) فلابد من التأكد من خلوه من تلك الأحياء المجهرية الممرضة، ولذلك فقد اشترطت منظمة الصحة العالمية **WHO** عام 1958م خلو مياه الشرب منها، حيث أن المياه تُشكل أحد أهم الوسائط لنقل الأحياء المجهرية الممرضة للإنسان. لكن الكشف أو التحري عن هذه الأحياء المجهرية الممرضة للإنسان لا يُعد من الفحوصات الروتينية التي تُجرى لمياه الشرب وذلك لتنوعها الكبير كما أنها قد تتواجد بأعداد قليلة جداً لذلك يتطلب التحري عنها بدقة استخدام كميات كبيرة من المياه تصل لعدة لترات، كما أنه ليس من السهولة عزلها وتشخيصها فذلك يتطلب استخدام مجموعة كبيرة من الأوساط الزرعية الاختيارية والتفريقية ثم عدد من الاختبارات الكيميوحيوية والسريولوجية (المصلية).

وحيث أن أغلب الأحياء المجهرية الممرضة التي تصل إلى المياه (كبكتيريا التيفويد والكوليرا والطفيليات المعوية والفيروسات المعوية وغيرها) يكون مصدرها تلوث هذه المياه بمخلفات برازية أو باختلاطها مع مياه الصرف الصحي...الخ، فإنه يمكن استخدام بعض أنواع البكتيريا المعوية (التي تتواجد في الأمعاء) كبكتيريا دالّة **Indicator Bacteria** على التلوث البرازي للمياه (وكذلك الحال بالنسبة للأغذية).

أن وجود هذه البكتيريا الدالّة Indicator Bacteria كدلائل حيوية Bio-indicators في الأغذية أو المياه له معنى واحد هو احتواها على الأحياء المجهرية الممرضة الآتية من مخلفات الأشخاص والحيوانات الحاملين لتلك المسببات المرضية المعوية. كما أن أعداد البكتيريا الدالّة (أو يمكن تسميتها ببكتيريا الدليل Indicator Bacteria) عند وجودها في أي عينة مفحوصة تكون بأعداد تفوق أعداد الأحياء المجهرية الممرضة بكثير مما يُسهل الكشف عنها معملياً، كما تتميز هذه الدلائل الحيوية بقدرتها على البقاء في الأغذية أو المياه لفترات زمنية أطول من الأحياء المجهرية الممرضة.

وتُلخص أهم الشروط والمميزات التى تتمتع بها بكتيريا الدليل Indicator Bacteria بالآتي:

1 – بكتيريا الدليل يجب أن تكون مناسبة لتحليل جميع أنواع المياه (مياه الصنبور، مياه النهر، المياه الجوفية، مياه السدود، مياه المسابح، مياه البحار، مياه الصرف وغيرها).

2 – بكتيريا الدليل يجب أن تتواجد كلما تواجدت الممرضات المعوية.

3 – بكتيريا الدليل يجب أن تبقى في المياه لفترات أطول من أي مسبب مرضي معوي شديد القدرة على الاحتمال.

4 – بكتيريا الدليل يجب أن لا تتكاثر في الماء الملوث (لا تعطي قيّم أعلى من قيمها الحقيقية).

5 – فحوصات وطرق الكشف عن بكتيريا الدليل يجب أن تكون سهلة الإداء.

6 – الاجراءات المتبعة للكشف عن بكتيريا الدليل يجب أن تكون شديدة الخُصُوصِيّة لها، بمعنى أخر يجب أن لا تعطي نتائج إيجابية مع أي بكتيريا أخرى، إضافة إلى أن تلك الاجراءات تكون عالية الحساسية للكشف عن مستويات منخفضة من بكتيريا الدليل.

7 – بكتيريا الدليل يجب أن لا تكون ممرضة.

8 – مستوى بكتيريا الدليل في الماء الملوث يجب أن يكون له علاقة مباشرة بدرجة التلوث البرازي.

9 – مدى استجابة بكتيريا الدليل لعمليات تنقية المياه ينبغي أن تكون مماثلة لاستجابة المسببات المرضية المعوية.

وتتوفر هذه الشروط والمميزات في مجموعة من الدلائل الحيوية Bio-indicators (أو ما اتفقنا على تسميتها ببكتيريا الدليل Indicator Bacteria) وهي:

أولاً - مجموعة بكتيريا القولون Coliform Bacteria:

وقد عرفنا سابقاً أنها بكتيريا سالبة لتصبيغ جرام، سالبة الإنزيم الاوكسيديز، عصوية غير متجرثمة يمكن أن تنمو هوائياً على بيئة أجار تحتوي على أملاح الصفراء، تخمر اللاكتوز خلال 48 ساعة عند 37°م مع إنتاج الحامض والغاز، ومن أهم أجناسها *Escherichia*، *Enterobacter*، *Citrobacter* وغيرها.

ان سهولة تنمية بكتيريا القولون وتفريقها جعلها تستعمل كدلائل على الشروط الصحية والتلوث البرازي للأغذية والمياه، وهي تُقسم إلى: بكتيريا القولون البرازية **Fecal Coliform** ويكون مصدرها التلوث عن طريق مياه المجاري أو براز الإنسان والحيوان وتتمثل في بكتيريا ***Escherichia coli*** والتي يعد وجودها كما ذكرنا سابقاً دلالة على تلوث من مصدر برازي **Fecal sours**، وبكتيريا القولون غير البرازية وهي إلى جانب تواجدها في الأمعاء يمكن أن تتواجد في التربة وأسطح النباتات....الخ ومن أهم أمثلتها بكتيريا ***Enterobacter aerogenes***. وكما عرفنا سابقاً يمكن تقدير أعداد بكتيريا القولون الكلية **Total Coliform**، وبكتيريا القولون البرازية **Fecal Coliform** إما بطريقة العدد الاكثر احتمالاً **Most Probable Number (MPN)** أو بطريقة المرشحات الغشائية **Membrane Filtration (MF)**.

ثانياً - <u>المكورات المعوية البرازية **Fecal Enterococci (Fecal Streptococci)**</u>:

أن عبارة **Fecal Streptococci** هي مصطلَح يستخدم لوصف مجموعة من البكتيريا الكروية السبحية التي يكون مصدرها الأمعاء، وقد عرفنا سابقاً (في الباب الثاني من هذا الكتاب) أنها كانت تتبع الجنس ***Streptococcus*** أما حالياً فتصنف ضمن جنس ***Enterococcus*** و من أهم أنواعه ***E. faecalis*** و ***E. faecium*** و ***E. avium*** و ***E. durans*** وغيرها. وعلى الرغم من ذلك فلايزال مصطلَح البكتيريا الكروية السبحية البرازية **Fecal Streptococci** يستعمل في كثير من الكتب وفي بعض المواصفات القياسية ولذلك جاء ذكره هنا.

وتتميز المكورات المعوية ***Enterococci*** بتحملها لدرجات الحرارة المرتفعة (فهي تنمو ضمن مدى واسع من درجات الحرارة يمتد بين 5-8°م ولغاية 48-50°م) ومقاومتها لنسب عالية من الملح تصل إلى 5- 6 % أو أكثر كما تتميز مقاومتها للأوساط القاعدية المرتفعة والتي تصل لغاية **pH 9.6**، كل ذلك جعل منها (إلى جانب بكتيريا القولون **Coliform**) أحد الدلائل الحيوية المهمة على الشروط الصحية والتلوث البرازي للأغذية والمياه.

إن أهم ما يميز المكورات المعوية البرازية (وعلى الأخص ***E. faecium***) هو أنها تتواجد في المخلفات الحيوانية بأعداد أكبر من بكتيريا ***Escherichia coli***، بعكس المخلفات البشرية التي تكون فيها أعداد ***E. coli*** أكبر من المكورات المعوية. ولذلك يتم إجراء فحص مزدوج لكلا بكتيريا الدليل لمعرفة مصدر التلوث البرازي هل هو ناتج عن المخلفات البشرية أو المخلفات الحيوانية أو كونه ناتج عن خليط منهما، ومن ثم اتخاذ الإجراءات المناسبة حيال معالجة هذا التلوث والحد منه. وعند إجراء فحص مزدوج لكلا بكتيريا الدليل يمكن ملاحظة الآتي:

1 – إذا كانت النسبة بين بكتيريا *E. coli* : المكورات المعوية البرازية أكبر من 4 دل ذلك دلالة أكيدة على أن التلوث مصدره المخلفات البشرية.

2 – إذا كانت النسبة بين بكتيريا *E. coli* : المكورات المعوية البرازية أقل من 0,7 دل ذلك على أن التلوث مصدره المخلفات الحيوانية أو مخلفات الدواجن.

3 – إذا تراوحت نسبة بكتيريا *E. coli* : المكورات المعوية البرازية بين 2 – 4 دل ذلك على أن التلوث خليط من المخلفات البشرية والمخلفات الحيوانية مع سيادة المخلفات البشرية.

4 – إذا كانت نسبة بكتيريا *E. coli* : المكورات المعوية البرازية بين 1 – 2 فإنه يصعب تفسير النتائج ولذلك يُقترح بأخذ عينة جديدة للتحليل تكون من أقرب مكان لمصدر التلوث.

ويمكن تقدير أعداد المكورات المعوية البرازية Fecal Enterococci بطريقة MPN باستخدام بيئة KF *Streptococcus* Broth أو Azide Dextrose Broth وتحضن على درجة حرارة 35°م لمدة 46 - 48 ساعة وبعد فحص الأنابيب المتسلسلة التي أعطت نتيجة إيجابية يتم تحديد قيمة MPN المقابلة لها مباشرة في جدول العدد الأكثر احتمالاً MPN.

كما يُمكن تقدير أعداد المكورات المعوية البرازية بطريقة المرشحات الغشائية باستخدام بيئة m-*Enterococcus* agar وذلك بترشيح عينة لا يقل حجمها عن 100 مليلتر بإمرارها خلال غشاء الترشيح المعقم الذي قطر مسامه 0,45 ميكروميتر ثم ينقل هذا الغشاء ويوضع فوق قرص الامتصاص المشبع بـ 2 مليلتر من بيئة m-*Enterococcus* agar ويحضن عند درجة حرارة 35°م لمدة 44 ساعة ثم تُعد المستعمرات التي تظهر بلون أحمر، كَسْتَنَائِيّ، أو وردي. ثم يُعاد زرع المستعمرات النامية على الوسط التأكيدي Bile Esculin Azide Agar وتحضن عند درجة حرارة 44°م لمدة ساعتان بعدها يُلاحظ شكل المستعمرات ولونها وقدرتها على تحليل الإِسْكولين، حيث تظهر مستعمرات المكورات المعوية البرازية Fecal Enterococci بلون قَمْحِيٌّ إلى أسود في الوسط المحيط بها دلالة على تحليل الإِسْكولين.

ثالثاً - بكتيريا *Clostridium perfringens* ومجموعة بكتيريا الكلوستريديا المختزلة للكبريت Sulfate Reducing Clostridia:

توجد بكتيريا ***Clostridium perfringens*** أيضاً في أمعاء الإنسان والحيوان ولكن بأعداد أقل من بكتيريا القولون، وهي تسبب التعفن وانتفاخ الجثث بعد الوفاة، إذ تنتقل من الأمعاء إلى جميع الأنسجة الداخلية مسببة حالات التعفن والانتفاخ هذه. ويوجد من هذه البكتيريا أنواع مرضية وأخرى غير مرضية والأنواع المرضية من هذه البكتيريا تسبب أمراض متعددة عند الإنسان والحيوان. وعلى الرغم من مخالفة ذلك لأحد الشروط المهمة التي تُميز بها بكتيريا الدليل والمتمثل في أن بكتيريا الدليل يجب أن لا تكون ممرضة، إلا أن ***C. perfringens*** تتميز بميزة مهمة كونها مقاومة للظروف السيئة وبالتالي فإن وجودها في المياه دلالة على تلوث هذه المياه بالمخلفات الصناعية التي تحوي عدد من المركبات ذات التأثير السمي على مجاميع بكتيريا الدليل الأخرى. وهذه البكتيريا تعيش في المياه مدة أطول مما يمكن أن تعيشه بكتيريا الدليل الأخرى وعلى الأخص بكتيريا القولون، وبالتالي فإن وجودها بمفردها في المياه يكون دليل على أن التلوث البرازي قديم ومضى عليه فترة من الزمن تزيد عن ثلاثة أيام وقد تصل إلى بضعة أسابيع.

أما بكتيريا الكلوستريديا المختزلة للكبريت **Sulfate Reducing Clostridia** فليست من أنواع بكتيريا الدليل النموذجية، حيث أنها تصنف ضمن مجموعة البكتيريا ذاتية التغذية كيميائياً وهي عبارة عن مجموعة من البكتيريا لاهوائية إجبارياً ولها القدرة على اختزال الكبريت إلى حامض الكبريتيك، لكنها تتواجد في البيئات المختلفة كالتربة والطمي ومياه الصرف الصحي حيث تتواجد كميات كبيرة من الكبريت. ولهذه المجموعة البكتيرية تأثير على الأنابيب الناقلة للمياه حيث تتسب في إحداث الصدأ وإكساب مياه شبكة التوزيع طعماً ورائحة غير مرغوب فيهما، كما يمكن أن ينتج عن تكوينها لمركب كبريتيد الهيدروجين مشاكل صحية كبيرة، وبالتالي فإن الكشف عن تواجدها في عينات مياه الشرب والمياه المعبأة يُعد من الفحوصات المهمة لتحديد الجودة الميكروبيولوجية لتلك العينات.

ويتم تنمية بكتيريا الكلوستريديا المختزلة للكبريت **Sulfate Reducing Clostridia** باستخدام بيئة **Sulfite Agar** أو بيئة **Modified Starkey's** أو بيئة **API RP-38** وجميع هذه الأوساط الغذائية تحتوي على مصدر للكربون وأملاح غير عضوية وعامل مختزل، وحيث أن الأوساط الغذائية الصلبة لس لها القدرة على تحديد عدد البكتيريا المتواجدة بدقة فإنه ينصح باستعمال الأوساط الغذائية السائلة لهذا الغرض. ومن أهم أنواع هذه المجموعة من البكتيريا ***Desulfotomaculum nigrificans***.

رابعاً - بكتيريا ***Pseudomonas aeruginosa***:

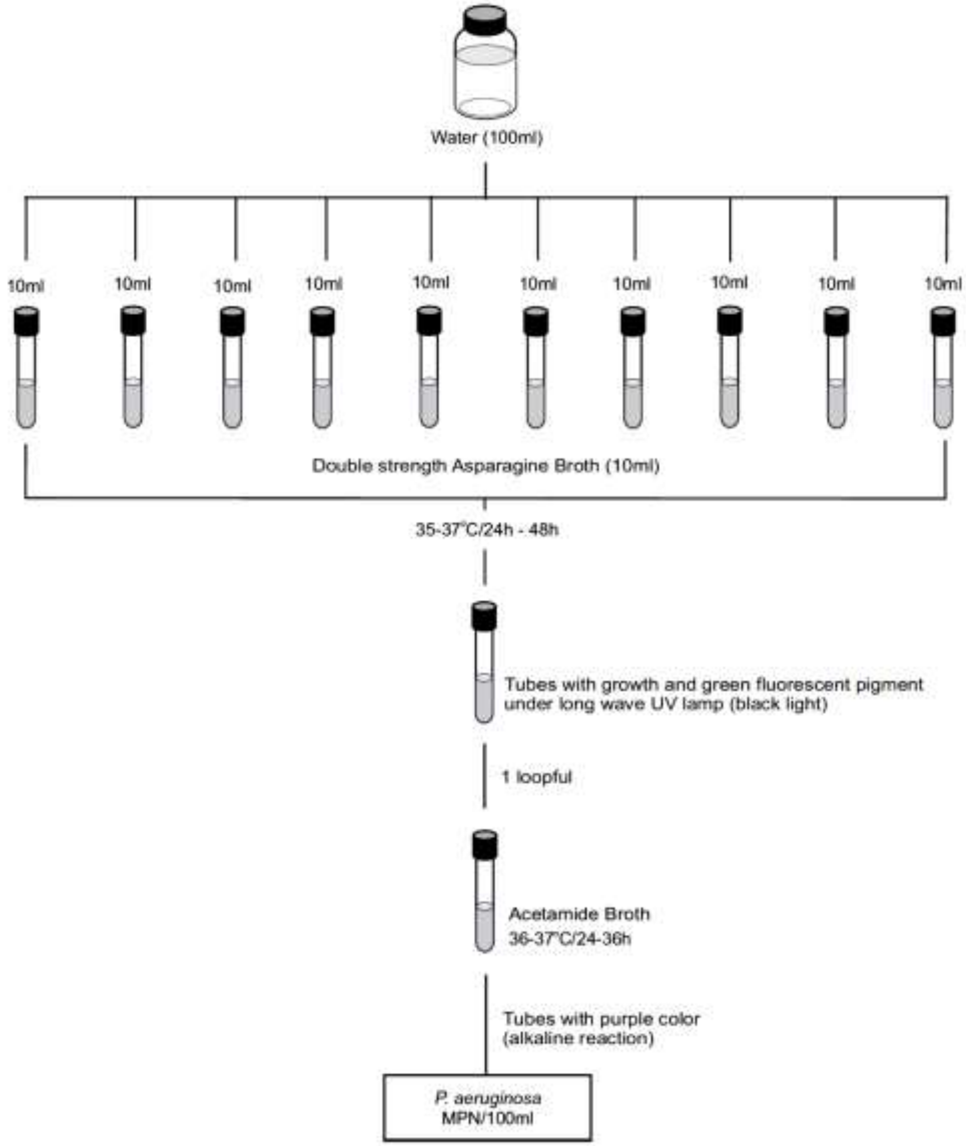
قد لا تعتبر بكتيريا *P. aeruginosa* من أنواع بكتيريا الدليل النموذجية، لكن يرتبط تواجدها في المياه التي تكون على درجة عالية من التلوث فهي مصاحبة للدلائل الحيوية الأخرى، وبالتالي تكون دليل إضافي على حجم التلوث، وتقدر نسبة أعدادها إلى أعداد *E. coli* بـ 1 : 10. وفي حال تراوحت أعدادها بين 1 – 10 لكل 100 مليلتر من الماء دل ذلك على أن التلوث قليل، أما إذا زادت أعددها عن 100 لكل 100 مليلتر من الماء دل ذلك على أن هذا الماء شديد التلوث.

أن بكتيريا *P. aeruginosa* لها القابلية على الالتصاق والبقاء على سطوح العبوات البلاستيكية وخاصة المصنوعة من مادة Poly phenyl chloride (PVC) مما يزيد من قابلية البكتيريا لمقاومة المعقمات، وبالتالي تشكل خطورة على الصحة العامة ولذلك يمكن استخدامها لتقيم الشئون الصحية في معامل إنتاج مياه الشرب المعبأة.

ولتقدير أعداد بكتيريا *P. aeruginosa* في الماء بطريقة MPN تُلقح 10 أنابيب تحوي كل منها على 10 مليلتر من حساء الأَسْباراجين Asparagine Broth المحضر بتركيز مضاعف بحيث يُضاف 10 مليلتر من عينة الماء لكل منها. تحضن على درجة حرارة 35 - 37°م لمدة تتراوح بين 24 - 48 ساعة. الأنابيب التي ظهر فيها نمو ويظهر فيها صبغة خضراء متفلورة Green Fluorescent Pigment عند فحصها بمصابيح الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة يُنقل جزء من النمو منها بواسطة الحلقة السلكية الناقلة لأنابيب حاوية على حساء الأسِيتاميد Acetamide Broth وتحضن على درجة حرارة 35 - 37°م لمدة تتراوح بين 24 - 36 ساعة. النتيجة الإيجابية تكون بظهور لون أُرْجُوانِيّ (قلوى). وهنا يتم تحديد قيمة MPN لكل 100 مليلتر من الماء من خلال جدول العدد الأكثر احتمالاً MPN التالي:

جدول رقم (35): حساب قيمة العدد الأكثر احتمالاً (MPN) لكل 100 مليلتر من العينة، لـ 10 أنابيب تُلقح كل منها بـ 10 مليلتر.

Positive tubes	MPN/100 ml
0	<1.1
1	1.1
2	2.2
3	3.6
4	5.1
5	6.9
6	9.2
7	12
8	16
9	23
10	>23



الشكل رقم (179) تقدير بكتيريا ***P. aeruginosa*** في الماء بطريقة **MPN**، عن (**Silva *et al*., 2013**).

وقد تستخدم بكتيريا *Staphylococcus aureus* التي تتواجد على جسم الإنسان في تجويف الأنف، ومنطقة الإبطين وما بين الفخذين للحكم على صلاحية مياه حمامات السباحة، خصوصاً وأنها أكثر مقاومة للتعقيم بالكلور (المستخدم لتعقيم مياه حمامات السباحة) أكثر من أي من بكتيريا الدليل الأخرى.

مواصفات مياه الشرب، المياه المعبأة والمياه الغازية:

مياه الشرب Drinking Water: تُعَرِف منظمة الصحة العالمية مياه الشرب على أنها الماء الصالح للاستهلاك الآدمي والاستعمال الحضري متضمناً النظافة الشخصية وإعداد الطعام والاستعمالات المنزلية الأخرى وفي الصناعات الغذائية وصناعة الثلج. ويجب أن يكون بمواصفات تسمح باستهلاكه مدى الحياة، وبالتالي فهي مياه عديمة الطعم واللون والرائحة، وخالية من الملوثات الميكروبية والكيميائية والإشعاعية الضارة يتم الحصول عليه من خلال تنقية ومعالجة مصادر المياه المختلفة سواء كانت سطحية Surface Water أو جوفية Ground Water. وتُصنف هذه المياه المعالجة من الناحية الميكروبيولوجية حسب الجدول التالي:

جدول رقم (36): تصنيف المياه المعالجة من الناحية الميكروبيولوجية.

الجودة	نتائج التحليل الدورية		ملاحظات
	Escherichia coli/ 100 ملليلتر	بكتيريا القولون الكلية/ 100 ملليلتر	
1 - ممتازة	صفر Zero	صفر Zero	في جميع العينات
2 - جيدة	صفر Zero	1 - 3	على أن لا تعزل بكتيريا القولون من عينات متتالية أو من أكثر من 5% من إجمالي العينات.
3 - متوسطة	صفر Zero	4 - 9	
4 - رديئة	خلية واحدة فأكثر	أكثر من 10 أو وجود بكتيريا القولون واحدة في عينات متتالية، أو في أكثر من 5% من إجمالي العينات التي يتم تحليلها.	غير صالحة للاستخدام ويجب إعادة معالجتها

* المصدر (التومي وسعد، 2008)

وبحسب المواصفة القياسية اليمنية رقم 2000/109 والخاصة بمياه الشرب العامة لابد أن تكون بصفة عامة عديمة الرائحة وذات طعم مقبول، ومن الناحية الميكروبيولوجية تشترط المواصفة أن تخلو المياه العامة المعالجة المنقولة داخل شبكة التوزيع او أي وسائط نقل اخرى (كصهاريج المياه المقطورة) من بكتيريا القولون الكلية Total *Coliform*، أما بالنسبة للمياه العامة الغير معالجة والمنقولة داخل شبكة التوزيع فيجب أن يجب ان تخلو 98 % من عينات مياهها المفحوصة خلال السنة من بكتيريا القولون الكلية. كما تنص المواصفة على أن مياه الشرب العامة يجب أن تخلو من الطفيليات (البروتوزوا) المسببة للمرض و الديدان الطفيلية التي تنقل أي من اطوارها الكامنة المعدية الى الانسان.

أمـا الميـاه المعبـأة **Bottled Water**: فهي الميـاه المعدة لأغـراض الشـرب المباعـة فـي محطات معالجة مياه الشرب (محطات تقليل ملوحـة ميـاه الشـرب أو مـا تعرف بمحطـات التحليـة). وهذه الميـاه يمكـن أن تكـون عرضـة للتلـوث بسـبب عدم اتبـاع الشـروط الصحيـة فـي انتـاج الميـاه المعبأة في محطـات التحليـة وعدم كفـاءة عمليـة التعقيم (بـالأوزون والاشـعة فوق البنفسجية) فـي تعقيم المياه المعبأة المنتجة، كما تشكل العبوات البلاستيكية كبيرة الحجم التي يُعاد استخدمها مراراً وتكراراً دون العناية بنظافتها أكبر مصادر التلوث لهذه المياه.

كما تشمل الميـاه المعبـأة **Bottled Water** أيضـاً الميـاه المعدة لأغـراض الشـرب المعبـأة بعبوات محكمة الاغلاق مصنوعة من البلاستيك أو من الزجاج، وينـدرج تحت هذا التعريـف الميـاه المعدنية الطبيعية والمياه المعدنية المكربنة طبيعيا أو ما تعرف بالمياه الغازية.

فالميـاه المعدنيـة الطبيعيـة **Natural Mineral Water** هـي تلك الميـاه التـي تسـتخرج مباشرة من المصادر الطبيعية أو الآبار المحفورة للمياه الجوفيـة وتتميز هذه الميـاه بمحتواهـا مـن بعـض العناصـر المعدنيـة ذات التواجـد النسـبي المميـز. أمـا الميـاه المعدنيـة مكربنـة طبيعيـا **Naturally Carbonated Mineral Water** فهـي الميـاه المعدنيـة التـي يتواجد غـاز CO_2 في مصادرها الطبيعية، وبعد معالجتها يتم إعادة أضافة الغاز من نفس المصدر.

وتقليداً للمياه المعدنية مكربنة طبيعيا نشأت صناعة جديدة هي صـناعة المشروبات الغازيـة **Carbonated Beverages** والتـي تحتـوي علـى مـاء مشـبَّع بغـاز CO_2 وشـراب مُركَّـز مـن مصـادر طبيعيـة كعصير الفاكهـة أو الزيـوت المسـتخرجة مـن جـذور النباتـات وقشـور الحمضيـات وأوراق النباتـات المختلفـة، أو بإضـافة نكهـات والـوان صنـاعية مماثلـة للطبيعيـة، مـع إضـافة سكر وحامض الستريك أو الفوسفوريك لإعطـاء المشروب طعم حامضـي حلو. إن هذه المضـافات التـي تعطي الشـراب المُركَّـز طعمـه ولونـه ونكهتـه قد تكون مصدر لتلوث المشروبات الغازيـة بالأحيـاء المجهرية، على الرغم من أن حموضة الشراب وتركيز السكر العالي إضافة إلى وجود غـاز CO_2 المذاب فيه يمكن أن يثبط نمو كثير مـن الأحيـاء المجهريـة، لكن ونتيجـة لجميـع تلـك العوامـل فـإن بكتيريا ***Leuconostoc mesenteroides*** التـي عرفنـا سـابقاً بأنهـا التـي تنمـو بصـورة جيـدة فـي تراكيـز عاليـة مـن السـكر كمـا تسـتطيع النمـو بشـكل جيـد فـي الأوسـاط الحامضـية وكـذلك الأنـواع الأخرى من بكتيريا حامض اللاكتيك إضافة إلى الخمائر قد تُشكل السبب الرئيس لفسـاد المشـروبات الغازية ومن أهم الخمائر المسببة لفساد المشروبات الغازية.

وفيما يخص المشروبات الغازية تنص المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) على ترفض إذا كان العدد الكلي للبكتيريا 3×10^2 في أي عينة من مجموع خمس عينات مفحوصة وتكون أعلى قيمة حدية مسموحة لعينة واحدة فقط من بين الخمس عينات المفحوصة هي 10^2، كما لا تحتوي العينات المفحوصة على بكتيريا القولون، أما فيما يخص الأعفان والخمائر فترفض العينات إذا كان عددها 10 مستعمرات في أي عينة من مجموع خمس عينات مفحوصة وتكون أعلى قيمة حدية مسموحة لعينة واحدة فقط من بين الخمس عينات المفحوصة هي مستعمرتين فقط.

الحدود الميكروبيولوجية لماء الشرب والمياه المعبأة وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء بخصوص مياه الشرب والمياه المعبأة ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (37): الحدود الميكروبيولوجية لمياه الشرب والمياه المعبأة والمشروبات الغازية

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
مياه شرب معبأة	*Coliform* Count	5	صفر	صفر	-
مياه شرب معبأة غير مكربنة	وحدة عينة الاختبار يجب أن تكون 250 ملليلتر				
	Coliform Count	5	صفر	صفر	-
	Pseudomonas aeruginosa	5	صفر	صفر	-
مياه شرب معبأة مكربنة	الأس الهيدروجيني pH	5	صفر	3,5	-
	عند وجود أي عينة تعطي أس هيدروجيني أكبر من 3,5 تطبق خطة التحليل المتبعة مياه الشرب المعبأة غير المكربنة				

تابع الجدول رقم (37): الحدود الميكروبيولوجية لمياه الشرب والمياه المعبأة والمشروبات الغازية

<table>
<tr><th rowspan="2">نوع المنتج</th><th rowspan="2"><u>الميكروبات</u></th><th colspan="4">الحدود / للمليلتر أو للغرام</th></tr>
<tr><th>ع</th><th>ق</th><th>م</th><th>ص</th></tr>
<tr><td rowspan="3">مياه شرب ـ صالحة للاستخدام الآدمي ـ عند المصدر وقت التعبئة</td><td>Coliform Count</td><td>10</td><td>1</td><td>صفر</td><td>10/ 100 مل</td></tr>
<tr><td>Fecal Enterococci</td><td colspan="4" rowspan="2">غير موجود في 100 مل من عينة الاختبار</td></tr>
<tr><td>Sulfate reducing Clostridia</td></tr>
<tr><td rowspan="3">مياه معدنية طبيعية معبأة (تخضع لمجموعتين من الفحوصات) <u>الفحص الأول هو</u>:</td><td>Escherichia coli
Thermotolerant Coliform</td><td colspan="4">أن تكون غير موجودة في أي عينة (1 × 250 مل)</td></tr>
<tr><td>Total Coliform Count
Fecal Enterococci
Pseudomonas aeruginosa</td><td colspan="4">في (1 × 250 مل) إذا كانت ≤ 1 أو ≥ 2 يُجرى الفحص الثاني، أما إذا كانت > 2 فترفض العينة</td></tr>
<tr><td>Sulfate reducing Clostridia</td><td colspan="4">في (1 × 50 مل) إذا كانت ≤ 1 أو ≥ 2 يُجرى الفحص الثاني، أما إذا كانت > 2 فترفض العينة</td></tr>
<tr><td rowspan="4">مياه معدنية طبيعية معبأة <u>الفحص الثاني</u>:</td><td>Total Coliform Count</td><td>4</td><td>1</td><td>صفر</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Fecal Enterococci</td><td>4</td><td>1</td><td>صفر</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Sulfate reducing Clostridia</td><td>4</td><td>1</td><td>صفر</td><td>2</td></tr>
<tr><td>Pseudomonas aeruginosa</td><td>4</td><td>1</td><td>صفر</td><td>2</td></tr>
<tr><td rowspan="3">المشروبات الغازية غير الكحولية</td><td>Total Bacterial Count</td><td>5</td><td>1</td><td>10^2</td><td>3×10^2</td></tr>
<tr><td>Total Coliform Count</td><td>5</td><td>1</td><td>صفر</td><td>10</td></tr>
<tr><td>Molds and Yeasts</td><td>5</td><td>1</td><td>2</td><td>10</td></tr>
</table>

الجزء الثالث

ميكروبيولوجيا الألبان

Dairy Microbiology

الفصل الثاني عشر

ميكروبيولوجيا الحليب Milk Microbiology

يعتبر الحليب مادة غذائية ممتازة لنمو الأحياء المجهرية حيث أنه وسط متكامل للنمو بما يحتويه من مواد بروتينية (حوالي 3.5 %) وكربوهيدرات (4.7 %) وفيتامينات وعناصر معدنية، كذلك فالرقم الهيدروجيني pH للحليب والذي يتراوح بين (6.4 إلى 6.8) إضافة إلى قيم جهد التأكسد والاختزال والتي تكون حوالي 300 ملي فولت تضع الحليب في الحالة المؤكسدة حيث تستطيع الأحياء المجهرية الهوائية إجباراً واللاهوائية اختياراً والمحبة للهواء القليل النمو فيه بسهولة، كل هذه العوامل جعلت من الحليب وسط غذائي وبيئة طبيعية ملائمة لنمو وتكاثر العديد من الأحياء المجهرية.

والحليب هو ما تفرزه الثدييات لتغذية صغارها، وحليب جميع الأنواع عبارة عن سوائل معقدة التركيب محتوية على عدد كبير من المكونات، وله صفات طبيعية خاصة، والمكون الرئيس لحليب الأبقار هو الماء والبقية تتكون أساساً من الدهون و البروتينات و الكربوهيدرات التي تكونت داخل الغدد الثدية، ويوجد كذلك ولكن بكميات أقل، مكونات معدنية ومواد ذائبة في الدهون أو في الماء انتقلت مباشرة من بلازما الدم أو بروتينات خاصة بالدم وآثار من الأنزيمات ومكونات وسطية في عمليات التكوين للحليب في الغدد الثدية. معظم الدهون موجود بصورة حبيبات صغيرة محاطة بغشاء يفصل الدهن عن الوسط المائـي، والبروتين الرئيسي هو الكازين، موجود بصورة حبيبات (جسيمات) متجمعة والصورة الطبيعية للدهن والكازين تؤثر على صفات الحليب الكامل وذات أثر مهم في عملية تصنيع الحليب. و تقتصر كمية الحليب التي تفرزها بعض الحيوانات الثدية على حاجة صغيرها حتى يبلغ أشده و يستقل بنفسه في الحصول على قوته، ولكن منـها (ولاسيما المستأنس كالأبقار والجاموس والماعز) تزيد كمية ما تدره عن حاجات صغيرها و قد استغل الإنسان هذه الزيادة من الحليب لنفسه بالاستفادة منها سواء بشربها أم تحويلها إلى زبد أو جبن أو غيرها من منتجات الألبان.

ويعرف الحليب بأنه السائل الناتج من إفراز الغدد اللبنية لإناث الحيوانات الثدية لغرض تغذية الصغار بعد الولادة. وكثير من التشريعات المتعلقة بالحليب في الدول المختلفة تعرف الحليب طبقا لظروف إنتاجه، ففي بعض البلدان ومنها الولايات المتحدة الأمريكية يعرف الحليب بأنه الإفراز الطبيعي الخالي من اللبأ (Colostrum) والذي يحصل عليه من حلب حيوان أو أكثر خالي من الأمراض وأن لا تقل نسبة المواد الصلبة اللادهنية عن 8.5 % والدهن عن 3.75 %.

كما يمكن تعريف الحليب (من الناحية التشريعية) بأنه الإفراز الطبيعي للغدة اللبنية الناتج من الحلب الكامل لحيوان ثدي واحد أو أكثر من نفس النوع سواء كان من وجبة واحدة أو أكثر والممزوج مزجاً جيدا وذلك خلال فترة الرضاعة وبعد انتهاء فترة إفراز اللبأ دون آن يضاف إليه أي مادة أو ينزع منه أي شيء من مكوناته. وتنص بعض المواصفات القياسية على أن الحليب الناتج من حيوان خلاف الأبقار يجب أن يميز بعبوات خاصة يبين عليها نوع الحيوان المحلوب منه الحليب، و يجب أن يكون الحليب خالي من الميكروبات المرضية وروعي في إنتاجه الشروط الصحية، ويشرط في الحليب الخام آن يكون نظيف خالي هن الشوائب ولم يسبق تسخينه وأن يكون طعمه طبيعيا ولونه ورائحته طبيعيين.

التركيب الكيميائي الإجمالي للحليب:

يحتوي الحليب على الماء والدهن والبروتينات وسكر الحليب إضافة إلى المعادن وان معدل التركيب الإجمالي لحليب الأبقار تقريباً كما يلي: الماء 87 % والدهن 3.25 - 4 % والبروتينات 3.2 - 3.5 % و سكر الحليب اللاكتوز 4.7 - 5 % والمعادن مقدره كرماد 0.7 %، وتشمل المعادن عادة الكالسيوم Ca، الفوسفور P، والسترات Citrate، والمغنيسيوم Mg، البوتاسيوم K، والصوديوم Na، والزنك Zn، والكلوريد Cl، والحديد Fe، والنحاس Cu، والكبريت Sulfate. وهناك مكونات تتواجد بنسب متناهية في الصغر مثل الأحماض العضوية أهمها في الحليب الطازج حامض الستريك. وهناك عدد من الإنزيمات أهمها البيروكسيديز، والكتاليز، والفوسفاتيز، واللايبيز. كما يحتوي الحليب الطازج المحلوب للتو على غازات O_2 و CO_2، و N_2. وكذلك يحتوي عدد من الفيتامينات مثل فيتامين A، C، D، والثيامين، والريبوفلافين وغيرها. والجدول التالي يوضح التركيب الإجمالي لحليب بعض الأنواع، ونلاحظ من هذا الجدول اختلاف التركيب الكيميائي للحليب تبعاً لاختلاف نوع الكائن بما يتناسب واحتياجات صغاره، وبشكل عام حتى ضمن إطار النوع الواحد يتباين تركيب الحليب بشكل واضح من وقت لآخر وهذا ما يوضحه الجدول رقم (39) في الصفحة التالية.

جدول رقم (38): يوضح التركيب الإجمالي لحليب بعض الثدييات

النوع	المواد الصلبة الكلية	الدهن	البروتين	اللاكتوز	الرماد
الإنسان	12.2	3.8	1.0	7.0	0.2
الأبقار	12.7	3.7	3.4	4.8	0.7
الماعز	12.3	4.5	2.9	4.1	0.8
الخراف	19.3	1.4	4.5	4.8	1.0
الحصان	11.2	1.9	2.5	6.2	0.5
الحمار	11.7	1.4	2.0	7.4	0.5
الفيل الهندي	31.9	11.6	4.9	4.1	0.7
الدبّ القطبي	47.6	33.1	10.9	0.3	1.4
الفقمة	67.7	53.1	11.2	0.7	-

جدول رقم (39): يوضح يتباين تركيب الحليب لضروب (سلالات) مختلفة من الأبقار.

السلالة	إنتاجية الحليب (كجم)/ عام	المواد الصلبة الكلية (%)	الدهن (%)	البروتين (%)	اللاكتوز (%)	الرماد (%)
Holstein	7360	12.16	3.54	3.29	4.68	0.72
Brown Swiss	6100	13.08	3.99	3.64	4.94	0.74
Ayrshire	5760	12.77	3.95	3.48	4.6	0.72
Guernsey	5270	14.04	4.72	3.75	4.71	0.76
Jersey	5060	14.42	5.13	3.98	4.83	0.77
Shorthorn	5370	12.90	4.00	3.32	4.89	0.73

ويفرز الحليب عادة بعد الولادة ولفترة خمسة أيام تقريباً على شكل لبأ وهو سائل تفرزه الغدد اللبنية بعد الولادة مباشرة يختلف في تركيبه عن الحليب العادي إذ يحتوي اللبأ على نسبة عالية من المواد الصلبة قد تبلغ حوالي 26 % وأن أكثر هذه المواد الصلبة هو الألبومين الذي تبلغ نسبته حوالي 16.5%، ولهذا فأن كثافة اللبأ قد تبلغ حوالي 1.068 جم/سم^2، بينما تبلغ كثافة الحليب 1.035 جم/سم^2، وله فوائد عديدة للرضيع فهو يحتوي على مواد غذائية عالية التركيز وخصوصاً المواد البروتينية والمواد المعدنية بجانب المواد الغذائية الأخرى والفيتامينات ومواد المناعة كما يعمل اللبأ على شكل ملين خفيف وبذلك ينظم حالة الجهاز الهضمي للرضيع.

جدول رقم (40): يوضح مقارنة غالبية المكوّناتِ والبروتينِات ذات الفعالية الحيوية للحليب الطبيعي واللبأ

المكون	اللبأ (Colostrum)	الحليب الطبيعي
البروتين الكلي (%)	21 – 8	4.8 – 3
الكازين (%)	6 – 3	3.8 – 2.6
الدهن (%)	11 – 3	6 – 3
الكاروتين (ppm)	300 – 50	1
الخلايا الجسمية (لكل مليلتر)	^{6}10 × (2 – 1)	^{4}10 × (30 – 2)
جلوبيولينات المناعة (%)	15 – 3	0.1 – 0.02
IgA (%)	0.62 – 0.32	0.01
IgG_1 (%)	8.7 – 4.8	0.04
IgG_2 (%)	0.29 – 0.16	0.005
IgM (%)	0.61 – 0.37	0.005
اللاكتوفيرين (جرام/لتر)	2 – 1.5	0.1
اللايسوزيم (ppm)	0.7 – 0.1	0.3 – 0.1
اللاكتوبيروكسيدز (ppm)	30	20

وفيما يلي سوف نتطرق بشكل مختصر إلى أهم المكونات الداخلة في تركيب الحليب وهي:

الماء (Moisture):

يحتوي الحليب على نسبة عالية من الماء تقدر بحوالي 87 % وهو من مكونات الحليب الرئيسة التي لها أهمية كبيرة من حيث إعطاء الحليب مواصفاته الطبيعية والمحافظة على التوازن الموجود بين مكونات الحليب وكونه وسطاً لإذابة الكثير من مكونات الحليب إضافة إلى أنه وسطا لنشاطات الكثير من الأحياء المجهرية وكذلك العامل المساعد في التفاعلات والتغييرات الكيميائية والحيوية التي تطرأ على الحليب بعد حلبه من الحيوان. هذا ويعتبر الماء الوسط الذي تتوزع فيه كافة مكونات الحليب الأخرى (المواد الصلبة الكلية) بشكل محلول حقيقي أو معلق. وتنتشر مكونات الحليب الصلبة الكلية في الحليب بثلاثة حالات، فالدهون تكون بحالة مستحلبة، في حين تنتشر البروتينات بشكل غروي نظراً لتواجدها في الحليب على هيئة جسيمات كروية صغيرة، أما سكر اللاكتوز و الأملاح المعدنية فتنتشر في الحليب بشكل محلول حقيقي.

الدهن (Fat):

يعتبر الدهن من المكونات الأساسية في الحليب كما وله أهميته بالنسبة إلى إعطاء الحليب ومنتجاته الطعم والنكهة واللون المرغوب كما وإن بعض التغييرات في الدهن قد تؤدي إلى تلف الحليب ومنتجاته. ومعظم دهن الحليب موجود بصورة حبيبات صغيرة محاطة بغشاء يفصل الدهن عن الوسط المائي. وتعتبر الحبيبة الدهنية الوحدة الممثلة للمادة الدهنية في الحليب وهي عبارة عن مجاميع أو مفردات من الحبيبات أحجامها بين 0.1 - 20 ميكرون وعددها بحدود 100 - 150 بليون حبيبة دهنية في اللتر الواحد من الحليب تختلف أشكال الحبيبات الدهنية من الكروي إلى البيضاوي ويمكن مشاهدتها بواسطة المجهر وهذه الحبيبات تتكون من عدة طبقات كما يلي:

1- الطبقة المدمصة الخارجية وتتكون من أساساً الكازين وتحاط هذه الطبقة بشحنات سالبة تساعد على انتشار هذه الحبيبات في الحليب، ولها أثر كبير في تحسين متانة غلاف الحبيبة الدهنية.
2- طبقة البروتينات الدهنية Lipoprotein وهي عبارة عن خليط من الدهون والبروتين الذي يختلف في مواصفاته الطبيعية عن البروتين الموجودة في الحليب، كما تحتوي هذه الطبقة على بعض الأملاح والفيتامينات والأنزيمات التي لها علاقة ببعض مواصفات الحليب وقيمته الغذائية.
3- طبقة الدهون الفسفورية Phospholipids وتحتوي على مجاميع من الفوسفوليبيدات إضافة إلى بعض الأحماض الدهنية القصيرة السلسلة وبعض الأنزيمات والأملاح ولها أهمية كبيرة بالنسبة إلى مواصفات الحبيبة الدهنية الطبيعية وإعطاء طعم ونكهة للحليب ومنتجاته كما وتؤدي إلى بعض من التغييرات في الحليب ومنتجاته والتي تؤدي إلى تلفه أحياناً.
4- القسم الداخلي من الحبيبة الدهنية فيحتوي على مجاميع الجلسيريدات الثلاثية Triglycerides التي تشكل الدهن الحقيقي.

ويمكن القول أن الدهون الموجودة في الحليب تكون إما على شكل المادة الدهنية الموجودة داخل الحبيبات الدهنية وهي تشكل حوالي 90 – 95 % من دهن الحليب، أو على شكل المادة الدهنية الموجودة بحالة طليقة Free Fat وتمثل الدهون الموجودة بحالة طليقة والتي نتجت عن عدم تكامل الحبيبات الدهنية أو تمزق أغلفة الحبيبات الدهنية وهي تشكل حوالي 2 – 3 % من دهن الحليب، أما الشكل الثالث من أشكال تواجد الدهن في الحليب فيكون على هيئة المادة الدهنية الموجودة ضمن غلاف الحبيبة الدهنية. وأهم المكونات الدهنية في حليب الأبقار هي الجلسيريدات الثلاثية (وتشكل 97 – 98 % من مجموع دهن الحليب) بالإضافة إليها توجد كميات قليلة من الجلسيريدات الثنائية (0.25 – 0.48 %) وجلسيريدات أحادية (0.016 – 0.038 %) والكولسترول (0.22– 0.41 %) وأحماض دهنية حرة (0.1 – 0.44 %) ودهون فسفورية (0.01 – 0.2%) وكذلك تتواجد في دهن الحليب الفيتامينات الذائبة في الدهن (A, D, E, K) إضافة إلى مركبات أخرى كالكاروتينات والاستيرولات، ويمكن أن توجد نسب أعلى من الجلسيريدات الثنائية و الأحادية و الأحماض الدهنية الحرة إذا ما تعرض دهن الحليب إلى تحلل دهني. وتحتوي معظم الأحماض الدهنية في دهن الحليب على 16 أو 18 ذرة كربون ونسبة عالية من الأحماض الدهنية ذات 18 ذرة كربون أحادية عدم التشبع، وكما في حليب جميع أنواع الحيوانات آكلة العشب فإن دهن حليب الأبقار يحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (4 - 14 ذرة كربون) وكمية قليلة من الأحماض الدهنية ثنائية عدم التشبع.

البروتينات (Proteins):

إن أهم بروتينات الحليب هي الكازينات اللاكتالبيومين واللاكتوجلوبيولين، ويعتبر الكازين البروتين الرئيس في الحليب وتصل نسبته إلى حوالي 80 % من مجموع بروتينات الحليب وهو مجموعة من البروتينات وهي (α s$_1$Casein و α s$_2$ Casein و β-Casein و κ- Casein). في حين أن اللاكتالبيومين α-Lactalbumins واللاكتوجلوبيولين β-Lactoglobulins والبيومين المصل Serum-albumin وجلوبيولينات المناعة Immunoglobulins التي تشمل (IgG_1 وIgG_2 و IgA و IgM) تشكل النسبة الباقية.

كذلك يوجد نوعان من البروتينات المرتبطة بالحديد بكميات ضئيلة واحدة منهما متطابقة مع ترانسفرين Transferin الدم والثانية خاصة بالحليب وبعض إفرازات الجسم وتسمى لاكتوفيرين Lactoferin ولهذه البروتينات دوراً هاماً في تثبيط تكاثر البكتيريا الملوثة للحليب عن طريق حرمانها من الحديد الضروري لنموها.

الكازين (Casein):

إن نسبة الكازين لحليب الأبقار حوالي 2.85 %. ويوجد الكازين في الحليب بصورة غروية ويحتوي على الكالسيوم في تركيبه الجزيئي لذلك يطلق عليه أحياناً أسم كازينات الكالسيوم ويرتبط هذا البروتين أيضاً مع فوسفات الكالسيوم الغروية $[Ca_3(PO_4)_2]$ الموجودة في الحليب. وتوجد جسيمات الكازين في حالة توازن Equilibrium في الحليب نتيجة للشحنات التي تحملها هذه الجسيمات، حيث تعتبر من العوامل الأساسية المحددة لبقاء الكازين بحالة ثابتة ومتوازنة. وعندما يترسب الكازين بفعل الحامض (مثلاً عند صنع اللبن الرائب) فإنه يفقد جميع الكالسيوم المرتبط به ويصبح كازيناً حامضياً ويذوب الكالسيوم. ولكن في صناعة الجبن يبقى الكالسيوم مرتبطا به عندما يترسب الكازين بفعل المنفحة ولكن يتغير تركيبه إذ يصبح بروتينا أخر يدعى باراكازينات الكالسيوم Ca-Paracaseinate. ويترسب الكازين في الحليب ترسيباً كاملاً عندما يضاف إليه حامض حيث يصبح تركيز الأس الهيدروجيني فيه pH 4.6 وتسمى هذه القيمة درجة التعادل الكهربائي للكازين Iso-Electric Point. يبدأ الكازين بالترسب في درجة الحرارة الاعتيادية عندما تبلغ حموضة الحليب 0.55 % (مقدرة كحامض لاكتيك) ولكن يمكن ترسيبه على حموضة اقل من ذلك (0.3 %) عند غليان الحليب، إن ارتفاع الحموضة بسبب فعالية الأحياء المجهرية الخاصة التي تحول سكر اللاكتوز إلى حامض لاكتيك يؤدي إلى نفس النتائج المذكورة في ترسيب الكازين وهو ما يحدث عند صناعة الألبان المتخمرة. إن أهم التغيرات التي تحصل للحليب (وخصوصاً للكازينات) بسبب ارتفاع الحموضة فيه ممكن تلخيصها بالنقاط التالية:

1- نقصان في نسبة سكر اللاكتوز وارتفاع نسبة حامض اللاكتيك.

2- إذابة فوسفات الكالسيوم الغروية Colloidal Tri-Calcium Phosphate المرتبطة بالكازين بفعل الحامض إذ تتحول إلى مركب فوسفات الكالسيوم الأحادية (Mono-Calcium Phosphate) والتي تكون ذائبة بطبيعتها مع تكوين لاكتات الكالسيوم.

3- بفعل الحامض يذاب الكالسيوم المرتبط بالكازين فتتحول كازينات الكالسيوم (Ca-Caseinate) إلى كازين حامضي مع تكوين لاكتات الكالسيوم أيضاً.

4- تزداد المواد المذابة بالحليب وبذلك يرتفع ضغطه التنافذي مما يوثر على درجة تجمده فتنخفض عن الدرجة الطبيعية.

5- يرتفع تركيز ايونات الهيدروجين وعندما يبلغ الأس الهيدروجيني (4.6 pH) يترسب جميع الكازين الموجود فيه.

ألفا لاكتالبومين(α-Lactalbumins):

يتميز هذا البروتين بنسبة واطئة نسبياً من النتروجين ونسبة عالية من الكبريت، وهذا البروتين ذائب في شرش الحليب ولكنه يتخثر بتسخين الحليب لدرجة حرارة عالية تصل لدرجة الغليان ولكن 10 % منه تتخثر عند بسترة الحليب (63°م لمدة 30 دقيقة) كما يترسب 90 – 95 % منه في حرارة 70°م.

بيتا لاكتوجلوبيولين (β-Lactoglobulins):

يختلف هذا البروتين عن اللاكتالبومين بأنه لا يذوب في الماء المقطر بل يذوب في المحاليل الملحية و الأحماض المعدنية.

بروتينات الحليب الأخرى و المركبات النيتروجينية غير البروتينية:

توجد مركبات بروتينية أخرى في الحليب وبنسب واطئة جدا مثل البروتينات المدمصة على غلاف الحبيبات الدهنية وكذلك إنزيمات الحليب وهناك أيضاً مواد نتروجينية غير بروتينية مثل الأحماض الامينية وبعض الفيتامينات و اليوريا وغيرها.

الكربوهيدرات (Carbohydrates):

يعد اللاكتوز المركب الكربوهيدراتي الغالب والخاص بالحليب فقط، ويوجد بالإضافة إلى ذلك تراكيز قليلة جدا من السكريات الأحادية والتي من بينها الجلوكوز والجلاكتوز والسكريات العديدة المتعادلة أو الحمضية وبعض الكربوهيدرات المرتبطة بالببتيدات والبروتينات.

الأملاح المعدنية (Minerals):

تمثل الأملاح المعدنية اعتيادياً بنسبة الرماد في الحليب والتي تعتبر قيمة تحليلية تمثل كمية العناصر غير القابلة للاحتراق فيه. وفي الحليب تكون هذه القيمة ثابتة تقريباً وتقدر بحوالي 0.7 % وان أي قيمة تتجاوز هذا الرقم تعني أن الغدد اللبنية تحت ظروف فسيولوجية غير طبيعية، ويعد الكالسيوم والمغنيسيوم والصوديوم والبوتاسيوم الكاتيونات (الأيونات الموجبة) الرئيسة في الحليب، في حين أن الفوسفات والكلوريد والسترات الأنيونات (الأيونات السالبة) الرئيسة فيه. ويوجد الصوديوم والبوتاسيوم والكلوريد في الحليب في صورة ذائبة متأينة ولكن بقية الأملاح موجودة في الغالب على صورة غير متأينة أو أملاح متأينة ضعيفة . باستثناء السترات فتكون كميات كبيرة منها موجودة بشكل غروي مرتبط بمعقد الكازين.

المكونات الأخرى الموجودة بشكل ضئيل (Minor or Trace Constituents):

هنالك عدد كبير من العناصر موجودة في الحليب بكميات ضئيلة، كما ويوجد عدد كبير من الأنواع المختلفة من المركبات النيتروجينية غير البروتينية، منها اليوريا. وتوجد كذلك كميات يمكن قياسها من عدة مواد ذائبة في الماء أو الدهون والتي من بينها الفيتامينات، ويمكن أن توجد مواد عرضية مثل عدد كبير من المركبات الوسطية في بناء مركبات الحليب وكذلك الإنزيمات

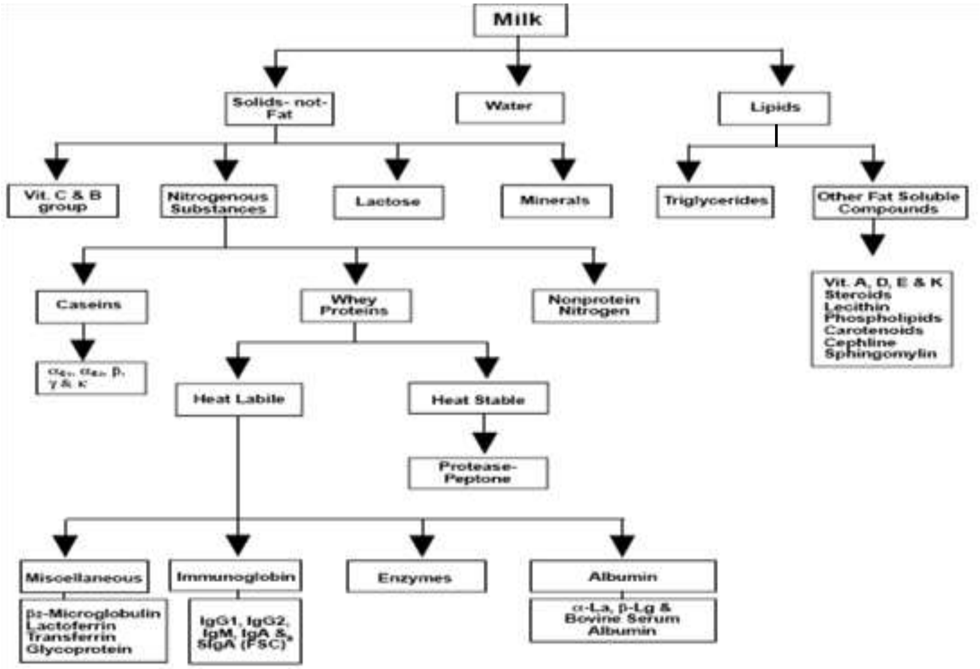
الموجودة طبيعياً في الحليب والتي يمكن تقسيمها حسب نوع تأثيرها إلى ما يلي:

1- إنزيمات تستخدم للكشف عن طبيعة المعاملات الحرارية التي أُجريت على الحليب ودرجة كفاءتها. ومن أهم أمثلتها إنزيم البيروكسيديز **Peroxidase** الذي يتدنتر على درجة حرارة 80°م أو أعلى لذلك يستخدم في الكشف عن الحليب المعامل حرارياً لدرجة حرارة أعلى من 80°م، وكذلك إنزيم الفوسفاتيز **Phosphatase** الذي يوجد منه نوعين هما إنزيم الفوسفاتيز الحامضي وإنزيم الفوسفاتيز القاعدي المستخدم في الكشف عن كفاءة البسترة.

2- إنزيمات تستخدم كدليل لمعرفة درجة جودة الحليب الميكروبية ومنها إنزيمات مختزلة مثل إنزيم **Aldehyde Reductase**، فكلما زادت درجة تلوث الحليب بالأحياء المجهرية ارتفع مقدار ما يحتويه من تلك الإنزيمات التي تعمل على إزالة لون بعض الصبغات مثل أزرق المثلين والريزازورين.

3- إنزيمات تستخدم كدليل الحالة الصحية للماشية مثل إنزيم الإميليز الذي تزداد نسبته في الحليب عن حدوده الطبيعية في حاله الإصابة بمرض التهاب الضرع، وكذلك في حالة إفراز اللبأ.

4- إنزيمات لها علاقة بالتغيرات التي تحدث للحليب ومنتجاته، ومنها إنزيمات اللاكتيز واللايبيز والبروتييز.



شكل رقم (180): يوضح التركيب الكيميائي الإجمالي للحليب الأبقار، عن (**Tamime and Robinson, 1999**).

الخواص الطبيعية للحليب:-

تعتمد الخواص الطبيعة للحليب على المواد الداخلة في تركيبه ولبعض هذه الخواص أهمية في الفحوصات التي تستعمل لمعرفة غش الحليب أو تغيره أو فساده وللبعض الأخر أهمية عند معاملة الحليب أو تصنيعه.

1- الطعم والرائحة:

كلما كان الحليب طازجاً كلما كان طعمه أقرب إلى الحلاوة بسبب وجود اللاكتوز، وعندها يتحول اللاكتوز إلى حامض اللاكتيك بتأثير الأحياء المجهرية يصبح مذاق الحليب حامضي وتشم منه آنذاك رائحة حامض اللاكتيك، كما يظهر الطعم الملحي في الحليب نتيجة زيادة نسبة الكلوريدات كما يحدث في نهاية موسم الحليب أو في حالة الإصابة بمرض التهاب الضرع.

والحليب الطازج عديم الرائحة فأي رائحة توجد في الحليب تتكون إما ناتجة عن مواد غريبة أو عن تحلل مكونات الحليب. ومن خصائص الحليب أنه سريع الامتصاص للروائح كالثوم والبصل ولاسيما إذا كان دافئاً وكذلك يتأثر برائحة العليقة التي يتغذى عليها الحيوان وكذلك رائحة الحظيرة، كما تتأثر مركبات الحليب بعوامل كثيرة كالإنزيمات والحرارة والضوء فتحدث تغيرات طبيعية وكيميائية تغير في طعم ورائحة الحليب.

2- اللون:

يرجع لون الحليب الأبيض غير الشفاف إلى تداخل الضوء مع الدهن والمواد الأخرى مثل الكازين ويكون انعكاس الضوء في الحليب بحالة يبدو للعيان فيها أبيض، ويعزى اللون الأبيض المصفر إلى وجود الكاروتين الذائب في دهن الحليب البقري والى وجود الرايبوفلافين الذائب في الجزء المائي، أما حليب الجاموس فإنه يبدو أبيض مزرق اللون بسبب انعدام الكاروتين فيه.

3- حموضة الحليب:

يتصف الحليب الطازج بأنه ذو تفاعل حامضي بسيط تعود حموضته الطبيعية إلى الكازين وأملاح السترات والفوسفات وغاز CO_2. ويتراوح الأس الهيدروجيني pH فيه ما بين 6.4 إلى 6.8 وبمعدل 6.6 ونظراً لتأثر هذه القيم بعوامل عديدة ومتغايرة أصبح من الصعوبة إعطاء رقم محدد لقيمة الحموضة مقدرة بطريقة المعايرة. وبعدد مكافئ لحامض اللاكتيك تقدر نسبة الحموضة في الحليب الطبيعي ما بين 0.14 – 0.18 % مقدرة كحامض اللاكتيك. وتعزى هذه الحموضة إلى الكازين (0,05 – 0,08 %)، بروتينات الشرش (0,01 %)، أملاح السترات (0,01 %)، والفوسفات (0,05 – 0,07 %)، وغاز CO_2 (0,01 – 0,02 %)، كما يحتوي الحليب الطازج نسبة أقل من 0,002% حامض لاكتيك.

إن تطور الحموضة في الحليب سببها تخمر سكر اللاكتوز الموجود في الحليب وتحوله إلى حامض لاكتيك، ويعود إلى عدة عوامل أهمها عدم العناية بإنتاج الحليب وكذلك تخزينه بعد الحلب بدون تبريد، وهذه الحموضة الزائدة سوف تودي إلى تتخثر بروتينات الحليب أثناء المعاملات الحرارية عند تصنيع هذا الحليب مما يؤدي إلى انسداد الأنابيب التي يسير فيها الحليب. وكما أن تقدير الحموضة في الحليب مهم في إعطاء فكرة عن مدى العناية بإنتاج الحليب، كذلك فهو مفيد في الكشف عن الحليب الناتج من حيوانات مصابه بالتهاب الضرع في حالة إعطاء التفاعل القلوي. وعليه فإن تقدير الحموضة في الحليب من أهم الاختبارات بالنسبة لمصانع الألبان، فلا يقبل الحليب المورد إذا زادت نسبة حموضته عن حد معين مسموح به ويساوي (0,2 %). ولتقدير الحموضة في الحليب يمكن اتباع طرق متعددة أهمها طريقة التعادل (المعايرة)، حيث يتم معايرة كمية معلومة من الحليب مع محلول هيدروكسيد الصوديوم معلوم التركيز.

كما يمكن الكشف عن تطور الحموضة في الحليب وزيادتها عن الحد المسوح (0,2 %) بطرق سريعة أخرى مثل اختبار الكشف عن تخثر الحليب بالغليان والذي تعتمد فكرته على أن الحليب يبدأ بالتخثر بالغليان إذا وصلت حموضته إلى نحو 0,23 % أو أعلى من ذلك، وفي هذا الاختبار يتم وضع 5 مليليتر من الحليب في أنبوبة اختبار ثم تغمر الأنبوبة في حمام مائي على درجة الغليان لمدة 5 دقائق، ترفع بعدها من الحمام المائي ويلاحظ وجود أي تخثر للحليب على الجدران الداخلية للأنبوبة من عدمه (في حال وجود تخثر فهذا يدل على أن الاختبار موجب ويرفض الحليب).

وهناك أيضاً اختبار سريع الكشف عن تطور الحموضة في الحليب وهو اختبار الكشف عن تخثر الحليب بالكحول، حيث يتخثر الحليب بالكحول إذا بلغت حموضته إلى نحو 0,21 % أو أعلى من ذلك، وفي هذا الاختبار توضع 5 مليليتر من الحليب في أنبوبة اختبار يضاف لها كمية مماثلة من الكحول الإيثيلي بتركيز 68 % (أو 75 %)، يمزج الحليب مع الكحول المضاف ويلاحظ وجود تخثر على الجدار الداخلي للأنبوبة من عدمه (في حال وجود تخثر فهذا يدل على أن الاختبار موجب ويرفض الحليب). كما نصل إلى نتيجة مشابهة (في اختباري التخثر بالغليان أو بالكحول) من الحليب غير الطبيعي كذلك الناتج بعد الولادة مباشرة (اللبأ)، أو إذا اختل التوازن الملحي للحليب نتيجة زيادة نسبة الكالسيوم والماغنسيوم إلى نسبة السترات والفوسفات (نتيجة إضرابات فسيولوجية لدى الحيوانات الحلوبة) وهذه الخاصية لها أهميتها في صناعة الألبان المكثفة والمجففة، كذلك يتخثر الحليب بالغليان أو بالكحول في حال وجود إنزيم الرنين البكتيري في حليب.

4- الوزن النوعي:

الوزن النوعي هو النسبة بين حجم معين من الحليب في درجة حرارة 15°م إلى وزن حجم مماثل لـه مـن المـاء فـي نفس الدرجـة الحراريـة. والـوزن النـوعي للحليـب البقـري يتـراوح بـين (1.029 – 1.035) تبعاً لاختلاف نسب مكوناتـه، حيث يحتـوي الحليب على مـواد تزيـد مـن وزنـه النوعي وهي إجمالي المواد الصلبة المنتشرة فيه كاللاكتوز والبروتينات والعناصر المعدنية، ولـهذا فإن وزنـه النوعي أكبر من الوزن النوعي للماء، كما أن الحليب يحتوي على الـدهن الـذي يقلـل مـن وزن الحليـب النـوعي وكلمـا ازدادت كميـة الـدهن فـي الحليـب كلمـا أثـر ذك فـي انخفـاض الـوزن النوعي، ولذلك فالوزن النوعي للحليب هو حصيلة الاوزان النوعية لمكوناتـه المختلفـة ويعبـر عنـه بالمعادلة التالية:

$$S = \frac{F + (T-F) + (100-T)}{F/M \times (T-F)/N \times (100-T)/T}.$$

حيث S = الوزن النوعي للحليب، T = النسبة الوزنية للمواد الصلبة الكلية، F = النسبة المئوية للدهن، M = الوزن النوعي للدهن، N = الوزن النوعي للمواد الصلبة غير الدهنية، (T-F) = النسبة الوزنية للمواد الصلبة غير الدهنية، و (100-T) = النسبة الوزنية للماء.

ويتغير الوزن النوعي للحليب بحجمه وإضافة الماء إليه أو فرز المـواد الدهنيـة منـه ولـذلك فإن معرفة الوزن النوعي للحليب يساعد على معرفـة مـا إذا كـان الحليـب مغشوشـاً أم لا، أي كدليل على إضافة الماء إليه أو نزع المواد الدهنية منه.

مصادر تلوث الحليب بالأحياء المجهرية:-

من الصعب الحصول على حليب معقم (خالي من الأحياء المجهرية) مهما كانت شروط الحلب جيدة من حيث النظافة والتطهير، أو كان الحيوان الحلوب سليم خالي من الأمراض، فالحليب يعد من المواد الغذائية سريعة التلف حيث تنمو فيه معظم الميكروبات وتتكاثر بسرعة محدثة فيه كثيراً من التغيرات غير المرغوب فيها التي يكون لها تأثير ملحوظ على صورة الحليب وقابليته لتصنيع منتجات لبنية منه. وتصل إلى الحليب أعداد كبيرة من الميكروبات الواردة من الحيوان والإنسان والأوعية المستخدمة ما لم تكن نظيفة ومعقمة، وقد يكون من بين تلك الميكروبات بعض الميكروبات الممرضة التي تؤدي إلى انتشار الأمراض بين افراد المستهلكين.

ومن أهم مصادر تلوث الحليب بالأحياء المجهرية ما يلي:

<u>1- تلوث الحليب داخل الضرع:</u>

من المعتاد أن يكون هناك أحياء مجهرية داخل الضرع تلوث الحليب أثناء عملية الحلب، والميكروفلورا الطبيعية للضرع قليلة أصلاً، فقد دلت دراسة شملت 600 بقره أن نحو 60 - 80% من هذه الأبقار أعطت حليب يحتوي على أقل من 1000 وحدة مكونة للمستعمرة/مل. وتقلل عمليات الحلب الآلي المعقمة من هذه الأعداد، وعند ارتفاع أعداد البكتيريا في الحليب بشكل كبير يكون السبب هو التهاب الضرع الناجم عن بكتيريا *Streptococcus* و بكتيريا *Staphylococcus*. و قد تعطي بعض الأبقار حليب حمولته الميكروبية أكثر من 1000 وحدة مكونة للمستعمرة/مل مع أن ضرعها سليم. وتكون القطرات الأولى من الحليب هي الأكثر تلوثاً ثم تقل الحمولة الميكروبية مع تقدم عملية الحلب، حيث أن الحليب يجرف معه الميكروبات سهلة الانتقال من حوض الغدة اللبنية وحوض الحلمة.

وقد أشار بعض الباحثين أن حليب الأغنام والماعز يكون معقم عند خروجه من الضرع.

<u>ومن وسائل تلوث الضرع بالأحياء المجهرية ودخولها إليه ما يلي:</u>

1- عن طريق صعودها خلال قناة الحلمة، حيث تنتقل غالبية الأحياء المجهرية العادية وبعض الأحياء المجهرية المرضية.

2- عن طريق الدورة الدموية، حيث تستطيع بعض الأحياء المجهرية المرضية الوصول إلى الضرع وبخاصة البكتيريا المسببة للسل.

والبكتيريا التي قد تتواجد في الحليب تنتمي إلى الجنسين *Corynebacterium* و *Micrococcus* وهي بكتيريا تتواجد على الجلد وتكون فاعليتها الإنزيمية محدودة. أما البكتيريا المرضية التي من الممكن أن تتواجد في الحليب فتتبع الجنسين *Streptococcus* و *Staphylococcus*، التي تتميز بكونها محللة للدم.

2- تلوث الحليب خارج الضرع:

هذا النوع من التلوث يشكل الجزء الأكبر من الحمولة الميكروبية للحليب. ويختلف بشكل كبير حسب ظروف إنتاج الحليب وتداوله وتخزينه. وأهم المصادر الرئيسة لهذا التلوث ما يلي:

أولا - الحيوانات الحلوبة (Milk producing animals):

يعد الحيوان نقطة البداية لإنتاج حليب نظيف "صالح للاستهلاك الآدمي" عالي الجودة (ذي محتوى بكتيري قليل)، ويمكن أن تتلوث حلمات الأبقار بين فترات الحلابة بالروث والطين ومواد الفرش في الحظائر مثل القش والنجارة وفتات الخشب والرمل. وإذا لم تُزل هذه الأوساخ قبل الحلب فإنها سوف تلوث الحليب، وتختلف أنوع وأعداد الكائنات الدقيقة حسب نوع وكمية الأوساخ على الحلمات، فالحليب من الأبقار التي لم تغسل حلماتها الملوثة بالروث يمكن آن يحتوي على عدد قد يصل إلى 100000 وحدة مكونة للمستعمرة/مليلتر، ويعد الحيوان المريض من أهم مصادر تلوث الحليب بمسببات الأمراض، مثل السل *Mycobacterium tuberculosis* و البروسيلا *Brucella* والـ *Coxiella* والحمي القلاعية Foot and mouth disease وغيرها. كما أن إصابة الحيوانات بالتهاب الضرع وخاصة الكامن sublinical mastitis تؤدي إلى وجود الأحياء المجهرية الممرضة في الحليب بإعداد كبيرة تصل إلى عدة ملايين. لذلك يجب إعطاء الحيوان عناية فائقة حتى نحصل على حليب نظيف. ويمكن تحقيق ذلك بما يلي:

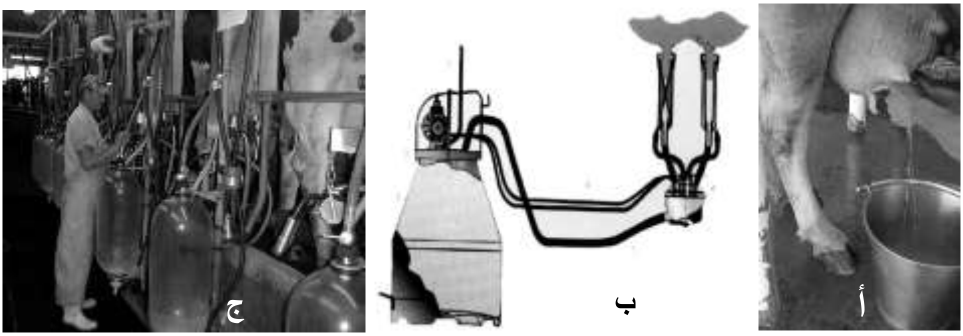
- **تنظيف الحيوان قبل الحلب مباشرة (مرة أو مرتين يومياً) لإزالة الروث وحلق الشعر الطويل الموجود على المنطقة الخلفية والضرع حتى لا تتعلق به القاذورات مع ربط الذيل أثناء الحلب.**
- **غسل الضرع بماء دافئ وبمحلول معقم ثم يجفف بقماش نظيف لأنه ما لم يجفف الضرع فإن ذلك يؤدي إلى تساقط ماء قذر في أوعية الحلابة كما يؤدي إلى تشفف الحلمات في الجو البارد.**
- **لا يحلب الحيوان في مكان به غبار ولا يقدم له علائق في أثناء عملية الحلب.**
- **التخلص من القطرات الأولي من الحليب لأنها تحتوي على نسبة عالية من الميكروبات (حيث أن الحليب يجرف معه الميكروبات سهلة الانتقال من حوض الغدة اللبنية وحوض الحلمة).**
- **فحص الحيوانات دورياً ضد مرض السل والإجهاض المعدي وحمى كيو والتهاب الضرع.**
- **عزل أي حيوان تظهر عليه أي أعراض غير طبيعية وبخاصة تلك المصابة بالتهاب الضرع.**
- **لا يستعمل حليب الحيوانات المعالجة بالمضادات الحيوية إلا بعد مرور 72 - 96 ساعة من أخر جرعة دواء أعطيت للحيوانات.**
- **يجب أن تكون هنالك فترة ساعة على الأقل بين تقديم العليقة للحيوان وعملية الحلب، ويجب كذلك عدم إعطاء العلائق التي تغير طعم الحليب مثل اللفت والكرنب والبصل والثوم إلا بعد الحلب مباشرة أو على الأقل قبل الحلب بمدة كافية (4 - 5 ساعات).**

ثانياً - الحلابون Dairy men:

تنتقل الميكروبات من الحلاب إلى الحليب عن طريق الأيدي غير نظيفة والملوثة بمسببات الأمراض أو عن طريق العادات السيئة مثل العطس أو السعال ومن أمثلة الأمراض التي تنقل من الإنسان المصاب أو الحامل للميكروب عن طريق الحليب حمى التيفوئيد Typhoid والخناق Diphtheria والحمى القرمزية Scarlet Fever والتهاب الحلق Sore throat، ومن أهم الاعتبارات التي يجب مراعاتها للإقلال من تلوث الحليب ما يلي:-

- يحظر على الأشخاص المرضى بأمراض التيفوئيد، التدرن الرئوي، الدفتريا، الحمى القرمزية، وكذلك الزحار أو الحاملين للميكروبات من التعامل مع الحليب وأوعيته والحيوانات الحلوبة.
- يفحص الحلابون دوريا ضد الأمراض المعدية، و يجب أن تكون بحوزتهم شهادات صحية تفيد خلوهم من تلك الأمراض.
- تجرى عملية الحلب بأيدٍ نظيفة وجافة (تغسل بالماء والصابون قبل ذلك) وهذا الأمر مهم في التقليل من عملية التلوث، كما يجب أن تخلو أيدي الحلابين من التقرحات العادية.
- التزام الحلابين بارتداء ثياب بيضاء نظيفة و أغطية للرأس.
- تتم عملية الحلابة في وقت قصير لمنع تعرض الحليب للأحياء المجهرية التي تلوثه.
- استخدام الحلب الآلي يعد من الطرق المهمة للحصول على حليب قليل التلوث و نظيف و يجب نشر التوعية بأهمية استخدام هذه التقنية في المزارع ذات الإنتاجية العالية والمتوسطة.

والشكل التالي يوضح عملية الحلب للأبقار.



شكل رقم (181) (أ) الحلب اليدوي، (ب) مخطط لعملية الحلب الآلي، (ج) عملية الحلب الآلي للأبقار.

ثالثاً - أواني الحليب Dairy Utensils:

من بين مصادر تلوث الحليب المختلفة تعتبر أواني الحليب أكثرها احتمالاً في زيادة عدد الأحياء المجهرية فيه بنسبة كبيرة كما يرجح أن تكون لها المقدرة على النمو السريع في الحليب أو منتجاته محدثة تغيرات غير مرغوب فيها. ويدخل في حكم أواني الحليب الأجهزة والأوعية التي يلامسها الحليب مثل سطول الحليب وآلات الحلب والمصافي والمبردات وأجهزة التنقية والتقليب وأجهزة الفرز والأنابيب والمضخات وأجهزة التجنيس والأحواض والقدور والزجاجات والعبوات المختلفة وأجهزة تعبئتها. ويتخلف عادة في أواني الحليب المختلفة المنظفة بالطرق العادية وخاصة إذا كانت تحتوي على أماكن لحام أو شقوق أو أركان وزوايا يصعب معاملتها بالفرشاة أو كانت تحتوي على بقع من الصدأ أو أي عيوب أخرى مشابهة، بقايا الحليب أو أي من مكوناته التي يمكن للأحياء المجهرية استعمالها كغذاء لها، ولا يلزمها بعد ذلك سوى الرطوبة الكافية والحرارة المناسبة، وهكذا تنقل الأوعية غير النظيفة الأحياء المجهرية وخاصة تلك التي تعيش بصورة جيدة في الحليب حيث تتكاثر عند ملامسة الحليب للوعاء الملوث وخاصة البكتيريا المتحملة للحرارة والبكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae*.

رابعاً - مصدر المياه Water supply:

من المعروف أن مورد مياه مزارع الألبان له أهمية عظمى في المحافظة على القواعد الصحية الجيدة فيها، وتزود مزارع الألبان بكميات كافية ووافرة من المياه النظيفة الملائمة من الناحية الكيميائية بحيث يجب التأكد من وجود الأملاح غير العضوية بالنسب المتعارف عليها لأن زيادتها تسبب عسر الماء مما ينتج عنه تكوين حصوات "الحليب الجيري" و يجب أن تكون المياه خالية من الميكروبات الضارة و الممرضة وذات محتوي بكتيري قليل و خالية من بكتيريا القولون البرازية، ويكون الماء غير الصحي أو الوارد من مصادر ملوثة من المصادر المهمة لتلوث الحليب بمسببات الأمراض و خاصة أنواع عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* التي تعد متطفلة داخل أمعاء الإنسان و الحيوان. وهناك أنواع تعيش مستقلة في التربة و معظم أنواعها ممرضة للإنسان مثل *Salmonella* و *Shigella* و *Klebsiella* وغيرها.

خامساً - بيئة الحيوانات (مباني مزارع الألبان و منشاتها):

تعد بيئة منازل الحيوان أو مزارع الألبان من المصادر المهمة للتلوث الميكروبي خاصة لوجود بعض الميكروبات العالقة والمسببة لبعض الأمراض مثل السل والمطثيات "*Clostridia*" وغيرها، ويجب أن تراعى الشروط الصحية عند بناء حظائر الأبقار سواء من ناحية التصميم أو النظافة، حيث يجب مراعاة ما يلي:

- تكون الأرضيات سهلة التنظيف حيث تقلل من فرص تلوث الحليب وأوعيته في أثناء الحلب.

- أن لا تكون المجاري من النوع المكشوف، وأن تكون النوافذ متسعة وعالية ومغطاة بالسلك.
- أن تدهن الجدران والأسقف بالجير لمزيد من الإضاءة ولتسهيل أغراض التطهير والتنظيف.
- تخصيص مكانا لعملية الحِلابة، تكون منفصلة ويراعى في تصميمها الشروط الصحية الجيدة.

شكل رقم (182) يوضح صالة للحلب الآلي وقد روعي في تصميمها الشروط الصحية الجيدة.

سادساً ـ الذباب والحشرات:

ينظر إلى الذباب على أنه عامل مهم في الشئون الصحية في مزارع إنتاج الحليب حيث أن بعض أنواعه ماصة للدماء تنقل الأمراض بين الحيوانات ويمكن أن تهيج أو تقلق الأبقار لدرجة كبيرة تقلل كثيراً من كمية اللبن المنتج، أما الذباب العادي كالذبابة المنزلية فبرغم من عدم لدغها الأبقار، إلا أن لها أهمية كبيرة في نقل الأمراض التي تسببها الأحياء المجهرية وانتشارها. حيث يلوث الذباب حلمات الأبقار وأواني الحليب وكذلك الحليب نفسه، ويحمل الذباب الأحياء المجهرية على أجنحته من أقذار البالوعات والبصاق الملوث وإفرازات الرحم و الخراجات **Abscesses** وغيرها ثم يلوث أوعية الحليب أو المياه. كما تنقل الحشرات الأخرى مثل الصراصير الذي يوجد في القاذورات وخاصة البراز مسببات الأمراض إلى أوعية الحليب ومن الميكروبات التي تنقل من الذباب إلى الحليب مسببات أمراض حمى التيفويد **Typhoid Fever** ونظير التيفويد **Paratyphoid** والسل **Tuberculosis** والخناق **Diphtheria** والجمرة الخبيثة **Anthrax**.

سابعاً ـ مخلفات الحيوان و الإنسان Sewage and waste products:

تعد المواد البرازية والفضلات العضوية الأخرى بجميع أنواعها مادة صالحة لتكاثر الذباب. ومن المهم أن يكون تداولها والتخلص منها بطرقة تجعل من الصعب على الذباب الوصول إليها حيث يمكن أن تكون إجراءات الإزالة التامة للمواد البرازية والفضلات العضوية من منشأة مزارع الألبان و التخلص الفوري منها. إما بنثر الروث على الأراضي الزراعية بطبقات رقيقة أو بتحويلها إلى سماد عن طرق التخزين مما يقلل من أعداد الذباب. و كذلك يجب التخلص من فضلات الإنسان لمنع التلوث و انتشار الأمراض.

الأمراض المنقولة عن طريق الحليب ومنتجاته (أولاً - أمراض منشؤها الحيوان):-

1- مرض السل لبقرى Bovine tubercubsis:

يعد مرض السل Tuberculosis من الأمراض المعدية، ويصيب عادة العقد اللمفاوية والرئة والكبد والضرع والعظام والمفاصل وبعض الأنسجة الأُخرى، وينتقل الميكروب إلى الحليب عادة من الضرع أو من روث الحيوانات المصابة خاصة العالق بضرع الحيوان والجوانب وأسفل البطن. ويلوث الحليب أحيانا من رشاش روث الحيوان أو من أجزاء البصاق التي تنتشر في هواء الحضيرة بواسطة سعال الحيوان المصاب بالسل أثناء الحلب.

2- البر وسيلا أو الحمى المتموجة أو الحمى البروسيلية Brucellosis:

تسمى البروسيلا في الحيوان مرض الإجهاض المعدي. وعندما يصاب الإنسان عن طريق الحيوان تسمى الحمى المتموجة Underant Fever أو الحمى المالطية Malta fever، ويصاب الإنسان بأي نوع من أنواع البروسيلا المجهضة *Brucella abortus* أو البروسيلا المالطية *Brucella melitensis* عن طريق تناول الحليب الملوث أو المنتجات اللبنية غير المبسترة أو عن طريق استنشاق قطيرات معلقة في الهواء الجوي المحتوي على الميكروب أو عن طريق ملامسة الحيوانات المصابة، وتظهر أعراض المرض في الإنسان على هيئة حمى متقطعة وضعف عام وعرق غزير وأحيانا صداع والآم في الظهر والرقبة والمفاصل والبطن.

3- الجمرة الخبيثة Anthrax:

الجمرة الخبيثة من الأمراض المعدية الحادة في الماشية وينتقل من الحيوان إلى الإنسان، وتسببه بكتيريا *Bacillus anthracis* التي تدخل جسم الإنسان بواسطة الخدوش والجروح في البشرة عند ملامسة الحيوانات المصابة أو جلودها أو دمها. ويعد نقل الميكروب عن طريق الحليب نادر الحدوث وإذا حدث فعادة ما يكون بسبب التلوث من إفرازات الحيوانات المصابة.

4- داء البريميات Leptospirosis:

يسبب عدد من الأنماط المصلية لبكتيريا البريمية *Leptospira* الأمراض في الماشية ويظهر المرض على هيئة التهاب الضرع. لقد سُجلت البريمية الدقيقة *L. pomona* سببا رئيسيا لداء البريميات في الماشية. وتعد بكتيريا *Leptospira* حساسة للحموضة، وهي لا تبقى في الحليب مدة طويلة وقد تصيب الإنسان إذا تناول حليب الحيوان المصاب بعد الحلب مباشرة.

5- داء اللستيرية Listeriosis:

وتسببه بكتيريا *Listeria monocytogenes* التي تسبب التهاب الضرع والإجهاض في الماشية. و لهذا تفرز البكتيريا في حليب الحيوان المصاب، و لقد تم عزل البكتيريا من الحليب والجبن غير المبستر كما تم عزله من التربة والروث والعلف المحفوظ Silage، وتؤدى إلى الإجهاض المتكرر عند المرآة الحامل و قد يحدث التهاب السحايا و المخ و تضخم العقد اللمفية.

6- داء المنثنية Campylobacterniosis:

تسببه المنثنية الصائمية *Campylobacter jejuni* والجنينية *C. fetus* الإجهاض أو العقم في الأبقار والأغنام، والنزلات المعوية والإسهال في الإنسان وتسبب التهاب الضرع في الأبقار أيضا. وقد سجلت عدة تفشيات لالتهاب الأمعاء Enteritis سببها بكتيريا المنثنية *Campylobacter* نتيجة تناول الحليب الطازج.

7- داء اليرسينية Yersiniosis:

هناك أنواع من بكتيريا *Yersenia* أهمها *Yersenia enterocolitica* التي أمكن عزلها من الحيوانات وخاصة الماشية وكذلك الأغذية ذات الأصل الحيواني مثل الحليب والجبن والمثلجات اللبنية Ice-Cream. وقد أمكن عزلها من ماء البحيرات والآبار والأنهار أيضا تؤدي البكتيريا إلى الالتهابات المعوية والتهاب العقد الليمفاوية المعوية والتهاب القولون.

8- التهاب الضرع Mastitis:

يعد التهاب الضرع من أهم الأمراض التي تصيب الحيوانات الحلوبة لتأثيره على صحة الحيوان و ما يتبع ذلك من الأضرار الاقتصادية، وتسببه أنواع كثيرة من البكتيريا منها: المكورات العقدية *Streptococci* و المكورات العنقودية *Staohylcocci* والوتدية *Corynebacterium* والعصويات القولونية وغيرها من تلك البكتيريا، أنواع تسبب أمراضا للإنسان عند تناوله الحليب الملوث بها. فـ *Streptococcus pyogenes* تسبب التهاب الحلق والعديد من الالتهابات القيحية أما المكورات العنقودية فتفرز سم معوي يؤدي إلى التهاب حاد وتغيرات خطيرة في جدار الأمعاء، تسبب الـ *Escherichia coli* التهاب المعدة والأمعاء خاصة في الأطفال. كما تسبب أنواعاً من الفطريات التهاب الضرع في الماشية وبعض الحالات المرضية في الإنسان مثل داء نوكادريا *Nocardia* والمبيضة البيضاء *Candida albicans* و *Cryptococcus*.

9- التهاب المعدة و الأمعاء Gastroenterits:

تظهر حالات من التسمم الغذائي أحيانا على مستهلكي الحليب المجمّع من حيوانات تعاني اضطرابات معوية و المسببات البكتيرية لهذا الالتهاب هي *Salmonella typhimurium*، و *Salmonella dublin* وغيرها، حيث تصل الميكروبات إلى الحليب عن طريق البراز الملوث.

10- الحمى المجهولة- حمى كيو (Q-fever)-(query fever):

ينتشر هذا المرض في الماشية و تسببه بكتيريا *Coxiella burnetii* التي تنتقل من حيوان إلى آخر عن طريق القراد، وتفرز البكتيريا في الحليب كما توجد بكميات كبيرة في النسيج المشيمي وسوائله، وتصاب الأغنام و الماعز أيضا بالبكتيريا التي تفرز في حليبها، وتبدأ أعراض المرض في الإنسان بالصداع و الفتور و ارتفاع درجة الحرارة الجسم و الآم في العضلات و قد تحدث أعراض في الجهاز التنفسي.

11- الحمى القلاعية Foot and mouth disease:

يسبب هذا المرض فيروس الحمى القلاعية وهو يصيب الحيوانات مشقوقة الظلف Cleaver footed و الفيروس معدي جداً للحيوانات و تظهر الأعراض بحمى أولا ثم تتكون حويصلات على الفم و الضرع و أعلى الظلف و بين الأصابع. و عند انفجار الحويصلات تترك أماكن مُعراة Erosions سطحية وأحيانا تتحول إلى قرحة، ويفرز الفيروس في الحليب عند وجوده في الدم أو يلوث الحليب عن طريق الحويصلات الموجودة على الضرع والحلمات، أو عن طريق اللعاب إثناء عملية الحلب. و تتشابه أعراض المرض في الإنسان و الحيوان وعادة ما يكون المرض حاداً في الأطفال الضعفاء.

الأمراض المنقولة عن طريق الحليب ومنتجاته (ثانياً - أمراض منشؤها الإنسان):-

1- السل البشري Human tuberculoses:

يعد بصاق الإنسان المريض المصدر الرئيسي لسل الإنسان لما يحتويه من بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *tuberculosis* و لهذا فإن العاملين في حلب الحيوانات أو تداول الحليب يجب أن يكونوا خالين من مرض السل وغير مخالطين لمرضى السل.

2- الحمى التيفية Typhoid fever:

وتسببها *Salmonella typhi* التي تنتقل من العاملين المصابين أو الحاملين للمرض إلى الحليب، كما يمكن أن تُنقل أيضاً عن طريق الذباب الذي ينقلها من مصادر التلوث بهذه البكتيريا.

3- الحمى نظير التيفية Paratyphoid fever:

تسببها *Salmonella paratyphi*، وتتواجد تلك البكتيريا في براز الأشخاص المصابين أو الحاملين للمرض أو في بولهم، و لقد سجلت بعض الحالات التي تصاب فيها الأبقار ويكون مصدر الإصابة هو الإنسان و بذلك يلوث الحليب.

4- التهاب الحلق و الحمى القرمزية Sore throat & Scarlet fever:

يسبب هذا المرض المكورة السبحية القيحية *Sterptococus pyogenes* التي تنقل من الحلاب إلى الضرع عن طريق قناة الحلب Teat canal و يتميز التهاب الحلق بحمى غير منتظمة Irregular fever مصحوبة بالتهاب الغدد الليمفية بالحلق و تضخمها و أحيانا مصحوبة بتكون خُراجات حول اللّوز Tonsils و الغدد الليمفاوية بالعنق Cervical Lymphnodes.

5- الخناق (الدفتريا) Diphtheria:

مرض حاد يتصف بالتهابات في الحلق وتكوين إفرازات Exudate وأغشية كاذبة فيه "يشبه التهاب اللّوز" بالإضافة إلى حالة التسمم الدموي التي تصيب المريض. يكثر هذا المرض بين الأطفال ويسببه بكتيريا الوتدية الخناقة *Corynebcterium diphtheriae* وينتشر المرض عند تلوث الحليب بالبكتيريا من الإنسان المصاب أو الحامل لها.

6- الزحار Dysentery:

يدعى الزحار الذي ينتج عن البكتيريا، بالزحار الباسيلي **Bacillary dysentery** وتسببه بكتيريا ***Shigella dysenterira*** و ***Shegella flexneri*** و ***Shigella sonne***. ويتلوث الحليب بهذه البكتيريا عن طريق أيدي الحلابين أو العاملين بمزارع الألبان المصابين أو الحاملين للبكتيريا وكذلك الأدوات الملوثة من مثل أوعية الحلب، و كذلك عن طريق الماء الملوث أو الذباب. و يتميز المرض بأعراض مختلفة كالإسهال و الآم الأمعاء، و ربما يصاحب ذلك ارتفاع في درجة حرارة الجسم و قد يكون براز المريض مخلوطا بالدم أو القيح أو المخاط.

7- الكوليرا Cholera:

يتسبب الحليب أحيانا في نقل بكتيريا ضمات الهيضة ***Vibrio cholera*** عند تلوثه عن طريق الإنسان المريض أو المتماثل للشفاء **Convalescent**، وتنتقل البكتيريا أحيانا إلى الحليب عن طريق الماء الملوث عند إضافته للحليب بغرض الغش **Adylteration**، وتبقى البكتيريا في الحليب مدة **1- 3** أيام تحت الظروف الطبيعية و لكن المعاملات الحرارة تقتلها.

8- عدوى الفيروس الغدى Adeno virus infections:

برهنت الدراسات السريولوجية **Serological studies** أن الماشية تصاب بالفيروس الغُدي للإنسان الذي لا يستطيع مقامة البسترة. وينقل الفيروس عن طريق الحليب الطازج وتنتج عنه الالتهابات في الجهاز التنفسي والبلعوم وملتحمة العين.

9- عدوي الفيروسات المعوية Entero Viruses infections:

تضم هذه الفيروسات السنجابية **Polio viruses** التي تؤدي لشل الأطفال و فيروسات **Echo viruses** التي تسبب الالتهاب السحائي، و فيروسات **Coxsachierus** التي تؤدي إلى أمراض مختلفة كالتهاب السحايا والتهاب الفم و الزكام و التهاب عضلات القلب عند الأطفال الصغار، كما تسبب تلك الفيروسات الإسهال عند الأطفال. يتلوث الحليب بالفيروسات عن طريق الإنسان المصاب و تستطيع أن تبقى في الجبن البقـري و الألبان المتخمرة.

10- التهاب الكبد المُعدى Infection hepatitis:

يفرز فيروس التهاب الكبد في براز الإنسان المصاب، وبذلك يلوث الحليب والماء ولقد سجلت علوم الأوبئة أن الفيروس ينتقل عن طريق الحليب والقشدة.

11- التسمم الغذائى Food Poisning:

سبق الحديث عن التسمم الغذائي خلال الجزء الأول من هذا الكتاب، ويمكن أن تحدث حالات التسمم الغذائي نتيجة تناول الحليب أو أحدى منتجاته التي تحوي على مسببات التسمم الغذائي المختلفة.

التغيرات التي تحدثها الأحياء المجهرية في الحليب الخام:

عند ترك عينة الحليب الخام الطازج المحلوب للتو على درجة حرارة الغرفة، تحدث لها مجموعة من التغيرات يطلق عليها في مجملها التخمر الطبيعي **Natural fermentation** وتنقسم هذه التغيرات إلى أربع مراحل هي:

1- فترة الإبادة الميكروبية Germicidal Period:

تمضى فترة على الحليب بعد حلبه من البقرة ينعدم فيها النمو الميكروبي، وفى بعض الأحيان يشاهد انخفاض التعداد الميكروبي فيه ويعزى هذا الانخفاض في التعداد الميكروبي لتأثير الإبادة الميكروبية للحليب، كما ويفسر أيضا بأنه نتيجة وجود ظروف غير ملائمة لنمو الأحياء المجهرية٠وقد وجد بأن فترة الإبادة الميكروبية تتفاوت في طول مدتها متوقفا ذلك على درجة الحرارة التي يتعرض لها الحليب فهي تكون فترة قصيرة في درجة الحرارة المرتفعة نسبيا وطويلة في درجة الحرارة المنخفضة، وكذلك فهي تختلف من حيوان لآخر وحتى أنها تختلف في الحيوان الواحد من وقت لأخر ومن ضرع لأخر. ويعزى هذا الأمر لتواجد الأنظمة المضادة للنمو الميكروبي **Antimicrobial Systems** في الحليب والتي أوجدها الخالق عز وجل لحماية الغدة اللبنية من العدوى كذلك لحماية الصغار الرضع من الأمراض المحتمل انتقالها عن طريق الحليب.

ويمكن تلخيص هذه الأنظمة المضادة للميكروبات في الحليب بما يلي:

أ- جلوبيولينات المناعة Immunoglobulin (Ig):

عبارة عن أجسام مضادة للبكتيريا الممرضة توجد غالبا في الحليب ويمكن أن تنتج في داخل الضرع (IgA) وقد تُنقل للحليب من الدم (IgG)، والوظيفة الرئيسة لهذه الأجسام المضادة هي حماية الصغار حديثي الولادة عن طريق الإكساب **Passive transfer**. والأجسام المضادة يمكن أن تسهم في خفض شدة مرض التهاب الضرع مثلاً بمعادلة السموم المفرزة أثناء المرض أو بالعمل على تسهيل ابتلاع البكتيريا من قبل كريات الدم البيضاء المتعددة أشكال النواة **PMN**.

ب- البلعمة Phagocytosis:

أن حماية الضرع من الالتهاب يعتمد بالدرجة الأولى على عملية البلعمة وقتل البكتيريا المهاجمة بواسطة كرات الدم البيضاء المتعددة أشكال النواة (PMN). والعد الكلي للخلايا في الحليب من أضرع غير مصابة تتراوح بين حوالي 100,000 إلى 500,000 خلية/مل والتي منها حوالي 10 % عبارة عن كريات دم بيضاء ذات نواة متعددة الأشكال PMN والأرباع المصابة يمكن أن تفرز حليب محتوي على 10,000,000 خلية/مل منها 90 % كريات دم بيضاء PMN، الزيادة في محتوى الحليب من الخلايا في حالة التهاب الضرع يسمح بتقويم حالة القطيع من حيث الإصابة عن طريق قياس الخلايا في حليب خزان المزرعة.

وتعد البلعمة والقتل بواسطة كريات الدم البيضاء PMN أقل فعالية في الحليب منها في الدم، وذلك يرجع بدرجة كبيرة لأن كريات الدم البيضاء PMN تستوعب كميات كبيرة من الدهن و الكازين وكنتيجة لتك القدرة المحدودة على البلعمة يصبح الضرع عرضة للالتهاب حتى بأعداد يسيرة من البكتيريا المهاجمة، وقد وجد أن زيادة محتوى الحليب من كريات الدم البيضاء(PMN) يزيد من مقاومة الضرع للالتهاب.

ج- اللاكتوفيرين Lactoferrin (LF):

اللاكتوفيرين أحد نظم الدفاع غير المتخصصة الموجودة في الحليب والتي لها نطاق نشاط واسع، وهو بروتين مرتبطاً بالحديد مشابه لترانسفيرين المصل Serum transferrin ويزداد وجوده وتركيزه في إفراز الحيوان غير المحلوب أو الحيوان المصاب بمرض ميكروبي. يثبط اللاكتوفيرين تكاثر البكتيريا بواسطة حرمانها من الحديد ويمكن أن يحمي الضرع من الإصابة بـ *Escherichia coli* وبالرغم من وجود اللاكتوفيرين في حليب الأبقار إلا أن التركيز المرتفع للسترات والمنخفض من البيكربونات يخفض لدرجة كبيرة القدرة على ربط الحديد وبذلك يقلل من القدرة المثبطة للاكتوفيرين.

د- أنظمة أُخرى غير متخصصة:

هناك أنظمة أُخرى غير متخصصة موجودة في الحليب لها فعل مضاد للميكروبات، مثل نظام لاكتوبيروكسيديز الحليب Lactoperoxidase/ثيوسيانات Thiocyanate/فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2، حيث يتكون لاكتوبيروكسيديز الحليب في الغدد الثدية ويوجد بتركيز مرتفع في حليب الأبقار وتوجد الثيوسيانات بنسب متغيرة مرتبطة أساسا بتغذية الأبقار، في حين أن المكون الثالث للنظام وهو فوق أكسيد الهيدروجين يمكن أن يتوفر من الأحياء المجهرية التي تتواجد داخل الضرع مثل الـ *Streptococci* أو بواسطة كريات ادم البيضاء ذات النواة متعددة الأشكال PMN. ويسبب نظام H_2O_2/Thiocyanate/Lactoperoxidase خلل أو تلف الغشاء السيتوبلازمي، مما يؤدي إلى فقدان أيونات البوتاسيوم K^+ والأحماض الأمينية والببتيدات، بالإضافة إلى تثبيط أنظمة انتقال السكريات والأحماض الأمينية وكذلك تثبيط تكوين الأحماض النووية DNA و RNA والبروتينات، وفي وجود فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2 يقوم لاكتوبيروكسيديز الحليب Lactoperoxidase بأكسدة الثيوسيانات SNC^- إلى نواتج غير مثبطة (SO_4^{--}, CO_2, NH_3) ومن خلال هذه التفاعلات يتم إنتاج مكونات وسطية سامة مثل الـ Hypothiocyanate $OSCN^-$ أو O_2SCN^- و O_3SCN^- (Oxyacids)، وهذه الأنيونات تكون نشطة جداً وتستطيع أكسدة مجاميع السلفاهيدريل SH groups في الإنزيمات المشاركة في أيض الأحياء المجهرية، فهي تسبب في تثبيط إنزيم الـ Hexokinase تثبيطاً تاماً، بينما تسبب في تثبيط إنزيمات الـ Dehydrogenase و 6-Phosphoglyconate و Aldolase جزئياً.

إن تأثير هذا النظام المثبط يكون مؤقتا فقط على نمو بعض الكائنات مثل بعض أنواع البكتيريا السبحية بينما يكون له أثر قاتل على البعض الآخر مثل ***Sterptococus pyogenes*** و ***Escherichia coli*** و ***Salmonella typhimurium***، وهناك شك في دور نظام بيروكسيديز الحليب في حماية الغدد الثديية بالرغم من أنه يمكن أن يساهم في حماية العجول من الإصابات المعوية، وقد اقترح الاستفادة من نظام **H_2O_2/Thiocyanate/Lactoperoxidase** كعملية تعقيم باردة لجعل الحليب مأمون الاستهلاك وبدون التغير الذي تحدثه المعاملات الحرارية للحليب.

إضافةً إلى نظام لاكتوبيروكسيديز الحليب/ثيوسيانات/فوق أكسيد الهيدروجين، هناك نظم أخرى مضادة للميكروبات في الحليب من ضمنها وجود إنزيم اللايسوزيم **Lysozyme** الذي يلعب دوراً فعالاً القضاء على الخلايا البكتيرية من النوع الموجب لصبغة جرام، بالإضافة إلى عوامل ربط فيتامين **B_{12}** وحامض الفوليك **Folic acid**.

2- فترة تطور الحموضة Souring Period:

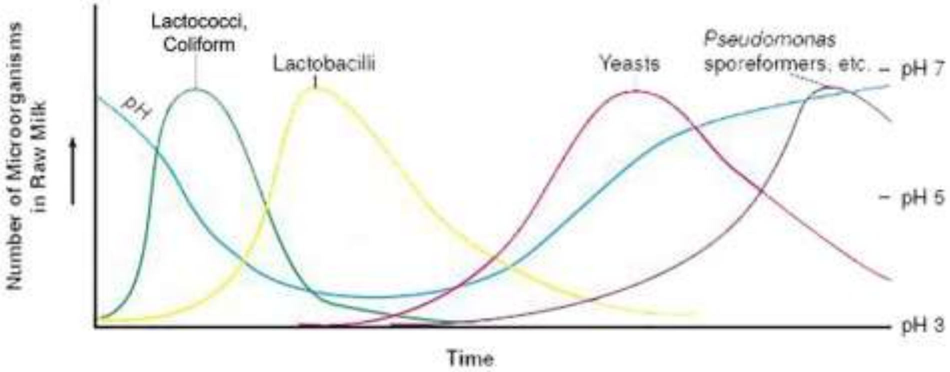
تنمو خلال هذه الفترة أنواع عديدة من الأحياء المجهرية ولكن الأنواع المسيطرة هي تلك المنتجة للحموضة، وهي التي تحول سكر اللاكتوز إلى حمض اللاكتيك بينما تكون التغيرات الأُخرى أقل بكثير من هذا التغير (تطور الحموضة). ويستمر إنتاج حامض اللاكتيك لمدة ساعات وقد يستمر لمدة أيام حتى يصل إلى درجة من التركيز يصبح تأثيره موقفاً لنشاط البكتيريا المنتجة له، حيث يتوقف نشاط بعض أنواع معينة منها عند وصول تركيز حمض اللاكتيك إلى **1 %** ويتوقف نشاط بعضها الآخر عند تركيز **2 %** وحتى **4 %**.

3- فترة التعادل Neutralization Period:

يتوقف نشاط معظم البكتيريا الموجودة في الحليب بعد تكون كميات كبيرة من حمض اللاكتيك ثم تبدأ بعدها فترة تنمو فيها الخمائر والأعفان فتستهلك حامض اللاكتيك المنتج الأمر الذي يترتب عليه نقص الحموضة وتشكيل وسط يميل إلى القلوية. وتتميز هذه الفترة بنمو الأعفان على سطح الحليب الذي يستمر لمدة عدة أيام أو أسابيع مسبباً تأكسد حامض اللاكتيك.

4- فترة التحلل Putrefaction Period:

تبدأ بعد تمام استهلاك حامض اللاكتيك من الحليب بسبب نمو الخمائر والأعفان التي تجعل من الحليب وسطاً متعادلاً أو قريبا من القلوية. وفى هذا الوسط تنمو أنواع البكتيريا المسببة للتفسخ التي كانت ساكنة طوال فترة تطور الحموضة، فتحدث في الحليب تغيرات غير مرغوبة، حيث تهاجم أنواع البكتيريا المسببة للتحلل الكازين بالحليب فتفككه وينتج عن ذلك انطلاق روائح كريهة، وهى تتعاون مع الخمائر وأنواع الأعفان فتجعل من الحليب سائلاً رائقاً يختلف تماما في مظهره عن الحليب الطبيعي، وهذا الناتج لا يصلح كغذاء وقد يسبب استهلاكه حدوث تسمم غذائي، ولكن نادرا ما يسمح للحليب بأن يبقى مدة طويلة لتحدث فيه مثل هذه التغيرات التي تجعل منه ناتجا غير قابل للاستهلاك.



الشكل رقم (183) يوضح التغيرات في المجاميع الميكروبية التي تحصل عند ترك الحليب الخام على درجة حرارة الغرفة وعلاقة ذلك بالتغير الحادث في الـpH، عن (Talaro and Talaro, 2002).

العلاقات بين الأحياء المجهرية في الحليب ومنتجاته:-

توجد الأحياء المجهرية في الحليب عادةً بصورة مختلطة، ونادراً ما توجد بصورة نقية. ويكون النشاط الميكروبي في الحليب ومنتجاته نتيجة فعالية ونشاط أنواع معينة من الأحياء المجهرية. وتتلخص العلاقة بين أنواع الأحياء المجهرية التي تنشط في الحليب ومنتجاته بما يلي:

1- التضاد Antagonism:

في هذا النوع من العلاقات ينمو نوعين أو أكثر من الميكروبات مع بعضها وينتج عن نشاط احد هذه الأنواع ضرر أو وقف نشاط الميكروب الأخر الذي يعيش معه ينتج هذا الضرر إما عن تغير في ظروف البيئة كتغير الأس الهيدروجيني أو نقص المواد الغذائية أو تكوين مادة سامة لأنواع الميكروبات الأخرى، وتعرف مثل هذه المواد أحياناً بالمضادات الحيوية. والتضاد ظاهرة معروفة منذ زمن بعيد، وقد ظهرت أهميتها العلمية عند اكتشاف البنسلين. وفي الحليب نجد أن نشاط البكتيريا المخمرة للاكتوز والمنتجة للحموضة تمنع نشاط البكتيريا المحللة للبروتين وخصوصاً الـ *Clostridium* و *Bacillus*، وذلك لان البيئة الحامضية المتكونة لا تصبح مناسبة لنموها. ومن الأمثلة الأُخرى على مثل هذه الحالة أيضاً هو تكّون مادة النيسين Nisin بواسطة بعض سلالات البكتيريا *Lactococcus lactis subsp. lactis* والنيسين Nisin مضاد حيوي يعمل على تثبيط أنواع من الميكروبات الموجودة في الحليب ومنتجاته، كذلك تكّون مادة الديبلوكوكسين Deplococcin بواسطة بكتيريا *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

2- التكافل Synergism:

هذا النوع من العلاقات يكون على أساس تعاون بين نوعين أو أكثر من الميكروبات بحيث يكون الناتج نتيجة هذا التعاون اكبر من إنتاج كل ميكروب على حده، أو يقوم كل نوع بأحداث تغيرات لا يستطيع أن يقوم بها إذا ما نمى بمفرده. ومن أمثلة ذلك ما يحدث في بادئ الزبد الذي

يحتوي مجموعتين، إحداها منتجة للحموضة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* والأُخرى منتجة للنكهة *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* والتي كانت تسمى *Leuconostoc dextranicum*، و*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* والتي كانت تسمى سابقاً *Leuconostoc citrovorum*، فالبكتيريا الأولى تقوم بتخمير سكر اللاكتوز مكونةً حامض اللاكتيك منه، أما الثانية فتقوم بتخمير حامض الستريك أو السترات في الحليب، مسببةً تكوين المركبات المسئولة عن النكهة، هذا مع ملاحظة أن بكتيريا النكهة هذه لا تستطيع أن تقوم بهذه العملية إلا إذا توفرت كميات من حامض اللاكتيك الذي تهيئه لها البكتيريا المنتجة للحموضة، فهي إذن لا تستطيع تكوين مواد النكهة إذا ما نميت بمفردها في الحليب.

3- تبادل المنفعة Symbiosis:

هذا النوع من العلاقات يكون عند ما يعيش كائنين أو أكثر مع بعضهما وينتج عن هذه المعايشة استفادة كل من هذه الكائنات نتيجة لنشاط كل منها. وأفضل مثال على هذه العلاقة علاقة التعاون في النمو في بادئ الزبادي *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* وكذلك *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* حيث يكون نموهما معاً أفضل، فالنوع الأول ينتج مركبات حامض الفورميك ومشتقاته وثاني أكسيد الكربون CO_2 والبيورينات والبريميدينات التي يحتاجها النوع الثاني الذي بدوره ينتج أحماض أمينيه وببتيدات ناتجة عن تحليلها لبروتينات الحليب، وهذه المواد في غاية الأهمية لنمو النوع الأول الذي لا يمتلك قدرة على تحليل البروتينات لإنتاج هذه المشتقات الضرورية لنموه ونشاطه بشكل جيد في بادئ الزبادي.

4- المنفعة من جهة واحدة Commensalisms:

وفي هذا النوع من العلاقات يستفيد احد الأنواع الميكروبية الموجودة في الحليب ومنتجاته من نشاط باقي أنواع الميكروبات الأُخرى ، كما هو الحال عند وجود بكتيريا هوائية وكذلك بكتيريا لاهوائية عصويه مكونة للأبواغ، ففي بعض الظروف الهوائية الخاصة تنمو البكتيريا الهوائية وتستهلك الأوكسجين وحينذاك تبدأ البكتيريا العصوية المكونة للأبواغ بالنمو عند توفر الظروف اللاهوائية. وكذلك في صناعة الجبن السويسري فان بكتيريا حمض اللاكتيك تخمر اللاكتوز مكونة حامض اللاكتيك، ثم يتحول إلى حامض البروبيونيك بواسطة بكتيريا *Propionibacterium*، أي أن حامض اللاكتيك وهو أخر نواتج عمليات التحول الغذائي لبكتيريا حامض اللاكتيك، يصبح مادة أساس لبكتيريا حامض البروبيونيك التي تحوله بعد ذلك إلى حامض البروبيونيك. كذلك ما يحدث عند تصنيع جبن الليمبورجرر **Limburger**، فسطحه يحوي على بعض الخمائر التي تتحمل درجات عالية من الملوحة وخاصة أثناء المراحل الأولى للنمو. هذه الخمائر تعمل على إقلال الحموضة في الخثرة، وتفرز مواد مشجعة لنمو ميكروبات أُخرى وخاصة تلك الحساسة للحموضة والمحللة للبروتين، والتي تكون مسئوله عن عمليات تصنيع هذا الصنف من الجبن.

أنواع الفساد الذي تحدثه الأحياء المجهرية في الحليب:

الأحياء المجهرية المتواجدة في الحليب الخام ونتيجة لنشاطها تغير الكثير من صفاته ومن أهم هذه التغيرات هي :

1- إنتاج حموضة ضعيفة Low acidity:

تنمو بعض الأحياء المجهرية في الحليب الخام وتكّون كمية قليلة من الأحماض بحيث لا تؤدي إلى تجبن الحليب (إي لا يحدث ترسب للكازين) مثال ذلك نمو بكتيريا *Micrococcus* واهم أنواعها *Micrococcus luteus* و *M. varians* كذلك جنس *Microbacterium* الذي يصل إلى الحليب من إفرازات الحيوان ومن أواني الحليب القذرة تكون حموضة قليلة في الحليب غير كافية لحدوث التجبن أهمها *Microbacterium lacticum* التي تقاوم درجة حرارة البسترة.

2- التجبن الحامضي Acid curdling:

وفي هذه المرحلة نتيجة نمو ونشاط بكتيريا *Lactococcus* في الحليب الخام وخاصة *Lactococcus lactis subsp. lactis* تتخمر كمية كبيرة من سكر الحليب وينتج عن هذا التخمر كمية كبيرة من حامض اللاكتيك حيث تزداد حموضة الحليب ويصل الأسّ الهيدروجيني إلى نقطة التعادل الكهربائي Isoelectric point (pH= 4.6) وعند هذه الدرجة يحدث ترسيب للكازين حيث يتجبن الحليب ويكون التجبن صلبا حيث لا تتكون غازات ولا يحدث تحلل للبروتين الأحياء المجهرية المسئولة عن التجبن تصل إلى الحليب الخام من العلف و الأواني القذرة.

وهناك أنواع أُخرى تسبب هذا التجبن *Lactococcus lactis subsp. cremoris* و *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* و *Lactobacillus acidipiscis* و *Lactobacillus casei subspecies casei* حيث يكون النشاط في البداية للـ *Lactococcus* إلى أن تصل حموضة الحليب إلى 1 % ثم ينشط جنس الـ *Lactobacillus* الـذي يتحمل الحـموضة حتى تركيز 2 – 3 % إي أن عملية التجبن عبارة عن عملية تخثر يتم فيها تحويل الحليب السائل إلى حالة شبه صلبه بسبب ترسيب بروتين الحليب Casein. وفي حالة التجبن الحامضي ينفصل سائل رائق يسمى الشرش Whey الذي يحتوي على بروتينات الشرش الذائبة والتي لم تترسب بفعل الحموضة، وهذه البروتينات تترسب بالحرارة.

3- التجبن الحلو Sweet curdling:

يحدث هذا التجبن نتيجة إفراز إنزيم يشبه الرنين من قبل بعض الأحياء المجهرية حيث يعمل على ترسيب الكازين وعادةً تلي هذه العملية عملية أُخرى حيث يهضم هذا التجبن من قبل أحياء مجهرية محللة للبروتين حيث تتراكم نواتج هذه العملية ويصبح الحليب قلوياً ومراً.

والأحياء المجهرية المسئولة عن هذا التجبن هي بصورة رئيسية والأحياء المجهرية الهوائية المكونة للأبواغ مثل *Bacillus subtilis subsp. subtilis* و *Bacillus cereus* و

أنواع من جنس *Pseudomonas* والتجبن الحلو يكون رخواً بعكس التجبن الحامضي حيث أنهما يختلفان بالصفات التالية:

أ- التجبن الحامضي يتكون نتيجة عملية تخمر وتكوين حامض في حين التجبن الحلو إنزيمي.

ب- في حالة التجبن الحامضي يحدث انخفاض في قيمة الـ pH بينما في حالة التجبن الحلو لا يحدث هذا الانخفاض بل قد تحدث زيادة في قيمة الـ pH.

ج- الشرش المكون من التجبن الحامضي لونه رائق وبدون رائحة بينما يكون في التجبن الحلو ذو رائحة مميزة.

4- إنتاج الغازات Gas production:

ويحدث ذلك نتيجة نشاط بكتيريا القولون والبكتيريا المكونة للأبواغ وبعض الخمائر تتكون كميات كبيرة من الغازات بالإضافة إلى بعض الأحماض ولذلك يتجبن الحليب ويتخلل هذا التجبن فقاعات غازية كثيرة. فبكتيريا القولون تخمر اللاكتوز وينتج غاز CO_2 والهيدروجين، في حين أن البكتيريا المكونة للأبواغ مثل *Clostridium butyricum* تنتج كمية هائلة من غاز CO_2 والهيدروجين، كما أن خمائر مثل *Candida pseudotropicalis* و *Torulopsis sphaerica* أيضاً تكّون غازات كثيرة في الحليب.

5- تحلل الدهون Lipolysis:

يحتوي الحليب على ما يقرب من 3.5 % دهن، وهذه الكمية تتحلل نتيجة تعرضها لإنزيم اللايبيز Lipase الذي تفرزه بعض الأحياء المجهرية النامية في الحليب أو منتجات الألبان، ونتيجة هذا التحلل تتكون أحماض دهنية حرة free fatty acids و جليسرول Glycerol، وبعض هذه الأحماض الدهنية تكون طيارة وذات طعم ورائحة حادة بحيث تجعل الحليب ذا طعم متزنخ Rancid taste. وهناك أنواع كثيرة من الأحياء المجهرية تستطيع تحليل دهن الحليب مثل *Pseudomonas fragi* و *P. fluorescens* وغيرها وخمائر مثل *Candida lipoltica* وأعفان مثل *Penicillium roqueforti* و *Penicillium camemberti*.

ولقد استغلت ظاهرة تحليل الدهون بواسطة الأعفان لإنضاج بعض أنواع الجبن وذلك بتنمية هذه الأحياء داخل الجبن لكي تحلل جزءاً من دهونها معطيةً نكهة مميزة لهذه الأنواع من الجبن كما هو الحال في جبن العفن الأزرق Roquefort وجبن العفن الرمادي Camembert.

6- تحلل البروتين Proteolysis:

يتعرض بروتين الحليب إلى التحلل نتيجة افراز الإنزيمات المحللة للبروتين وتراكم نتيجة هذا التحلل مواد وتعطي رائحة عفنة للحليب وطعماً مراً و تزيد من قلويته مثال ذلك أنواع من كل من الأجناس التالية: *Pseudomonas*، *Clostridium*، *Bacillus*، *Proteus*، *Enterococcus*، كذلك فقد استغلت قابلية الأعفان على تحليل البروتين في عملية إنضاج الجبن.

7- أنتاج اللزوجة Ropiness:

يمكن حدوث اللزوجة أو التكون الخيطي في الحليب أو القشدة أو الشرش، ولهذه العملية أهمية خاصة في تسويق القشدة و الحليب و يعزى حدوث اللزوجة أو التكون الخيطي في بعض الأحيان إلى عوامل غير ميكروبية مثل:

(1) تكون خيوط نتيجة إصابة البقرة بمرض التهاب الضرع Mastitis و خصوصاً بواسطة الفايبرن وكريات الدم البيضاء التي تصله من دم البقرة، وتكون هذه الحالة عندما يكون الحليب طازجاً.

(2) هناك نوع من اللزوجة تنتج عن سُمك طبقة القشدة كما نلاحظه في الجزء العلوي من الحليب.

(3) قد ينتج التكون الخيطي بسبب تكون غشاء رقيق من الكازين أو اللاكتالبيومين خلال عملية التبريد كما نلاحظه في بعض الأحيان على سطح أجهزة التبريد السطحي.

إن جميع هذه التأثيرات السابق ذكرها مؤقتة، وتختلف عن اللزوجة الناتجة عن الأحياء المجهرية، حيث أن اللزوجة الميكروبية تكون ناتجة عن المركبات اللزجة الموجودة في كبسولة الخلية البكتيرية المكونة من الصموغ والمواد المخاطية. وهذه تحدث عندما يخزن الحليب في درجات حرارة منخفضة. وينخفض مقدار اللزوجة عندما ترتفع نسبة حموضة الحليب أو القشدة.

وهناك نوعان رئيسيان من اللزوجة المتشكلة بفعل البكتيريا أولهما عندما تكون لزوجة الحليب ظاهرة في الجزء العلوي منه، أما النوع الآخر فتكون اللزوجة منتشرة فيه بصورة متجانسة. تنتج اللزوجة السطحية عموما عن جنس *Alcaligenes* الذي يأتي من الماء أو التربة وينمو جيداً في درجة حرارة 10°م.

أما اللزوجة التي تحدث في جميع أجزاء الحليب فتسببها بعض سلالات بكتيريا القولون مثل ***Enterobacter aerogenes*** و ***E. cloacae*** ونادرا ما يكون بسبب ***Escherichia***. وأسوا مـــا تكون اللزوجة المتشـكلة بسبب بكتيريا ***E. aerogenes*** عند سطح الحليب. كما أن بعض سلالات بكتيريا حامض اللاكتيك مثل ***Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*** و ***Lactobacillus plantarum*** و ***L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*** و ***L. casei*** تسبب اللزوجة أو التكون الخيطي في الحليب.

الشكل رقم (184) حدوث اللزوجة أو التكون الخيطي في الحليب، عن (Frazier and Westhoff, 1997).

8- تغيرات النكهة Flavor alterations:

للحليب الطازج نكهة خاصة وهى قابلة للتغير بسهولة، هذا ويمكن أن يكون الحليب الذي حلب حديثا من الحيوان غير اعتيادي في نكهته بسبب فردية البقرة أو بسبب إصابتها بمرض التهاب الضرع أو بسبب العليقة.

أما النكهات التي تتشكل بعد الحلابة فيجوز أن تكون ميكروبية أو بسبب النكهات الممتصة أو نتيجة تعرض الحليب للضوء أو تماسه مع المعادن أو بسبب التزنخ الذي يحدثه إنزيم لايبيز الحليب. وفيما يلي بعض النكهات غير الطبيعية المتسببة عن الميكروبات الموجودة في الحليب:

أ- النكهة الحامضية **Acidic flavor:**

توصف نكهة الحموضة بكونها عادية عندما تنتج بواسطة بعض أنواع بكتيريا حامض اللاكتيك مثل *Lactococcus lactis subsp. lactis* أو توصف بأنها عطرية عندما تتعاون بكتيريا حامض اللاكتيك مع بكتيريا النكهة *Leuconostoc* أو توصف بأنها حادة وغير مرغوبة عندما تنتج كميات لا بأس بها من الأحماض الدهنية الطيارة مثل حامض الفورميك والخليك والبيوتريك بواسطة بكتيريا القولون وجنس *Clostridium* وأنواع بكتيرية أُخرى .

ب - الطعم المر **Bitter taste:**

أن الحليب المأخوذ من أبقار متأخرة في الولادة يكون أحياناً طعمه مراً، كذلك فان التحلل البروتيني بواسطة الأحياء ينتج عنه الطعم المر في الحليب. بعض الأنواع المسببة للطعم المر هي بكتيريا القولون وبعض الخمائر كما أن بعض المكورات البكتيرية *Micrococcus* تعطى حليبا مراً وكذلك الأمر مع الاكتينومايستس *Actinomycetes* التي تعطي الطعم المر في بعض الأحيان.

ج – نكهات أُخرى **Other flavor:**

هناك نكهات مختلفة تسببها أنواع متعددة من الأحياء المجهرية واهم هذه النكهات هي:

(1) نكهة شبيهة بنكهة اللفت(Turnip like flavor) تسببها بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* و *Escherichia coli*.

(2) نكهة سمكية (Fishiness flavor) تسببها بكتيريا *Pseudomonas mucidolens*.

(3) نكهة ترابية (Earthy odor) يسببها جنس *Actinomycetes*.

(4) نكهة الفاكهة (Fruity flavor) وطعم الخميرة (Yeasty taste) وكذلك نكهة الكحول (Alcoholic flavor) يسببها نمو أنواع مختلفة من الخمائر.

(5) نكهة الكحول الاميلي (Amyl alcohol flavor) يسببها أنواع من جنس *Micrococcus*.

(6) النكهة المتفسخة (Putrefactive flavor) يسببها جنس *Clostridium*.

<u>9- تغيرات لون الحليب **Color changes:**</u>

يتأثر لون الحليب أو القشدة بتغير التركيب الكيماوي لهما وتغير حالتهما الفيزيائية كمقدار اللون الأصفر الذي يتحدد بكمية الدهن الموجودة فيه ومقدار ما يحتويه من الدم أو القيح. تغيرات اللون المسببة عن الميكروبات تحدث ضمن التغيرات المذكورة آنفاً. و يحدث التغير في اللون في بعض الأحيان نتيجة لنمو البكتيريا أو الأعفان الملونة حيث يكون النمو على شكل حلقة أو رغوه على سطح الحليب أو خلاله.

(1) الحليب الأزرق **Blue milk:**

تسبب بكتيريا ***Pseudomonas synxantha*** اللون الرمادي المزرق حتى اللون البني في الحليب عندما ما تنمو فيه دون منافسة الأحياء الأُخرى ، لكنها عندما تنمو فيه مع بكتيريا حـــامض اللاكتيك مثل ***Lactococcus lactis subsp. lactis*** فإنها تكسب الحليب اللون الأزرق الغامق. وقد يحدث هذا التلون نادرا نتيجة لنمو الاكتنومايسيتات وكذلك نمو عفن ***Geotrichum*** في الحليب.

(2) الحليب الأصفر المخضر **Yellow green milk:**

وهذا النوع من التلون في الحليب تسببه بكتيريا ***Pseudomonas fluorescens*** التي تفرز صبغة صفراء مخضرة ذات وميض تدعى **Fluorescien** وهي ذائبة في الماء.

(3) الحليب الأصفر **Yellow milk:**

يتلون الحليب باللون الأصفر خاصةً طبقة القشدة بسبب ***Pseudomonas synxantha*** وكذلك أنواع من جنس ***Flavobacterium***.

(4) الحليب الأحمر **Red milk:**

قد يتلون الحـليب باللـــون الأحـــمر نتيجــــة لوجـــود بكـــــتيريا مـــن نـــــــــوع ***Serratia marcescens* subsp. *marcescens***، كما تنتج بكتيريا ***Micrococcus roseus*** راسباً احمر في الحليب و كذلك الخميرة ***Torula glutinis*** فتعطى مستعمرات وردية أو حمراء على سطح الحليب أو القشدة الحامضة، كما يمكن أن يكون اللون الأحمر في الحليب بسبب كريات الدم الحمراء بسبب وجود الدم مع الحليب للأسباب مرضية، ويمكن ملاحظة ذلك بواسطة ترسيب كريات الدم الحمراء بواسطة الطرد المركزي.

الفصل الثالث عشر

إنتاج الحليب النظيف Clean Milk Production

يقصد بالحليب النظيف ذلك الحليب الناتج عن حيوانات سليمة خالية من الإمراض والذي يكون محتواه البكتيري قليلاً كما أنه يكون خالياً من القاذورات والشوائب المرئية، وتقتضي الظروف المثالية لإنتاج حليب نظيف مضمون صحياً أن يحصل عليه من ضرع سليم لحيوانات نظيفة خالية من الإمراض. أما الخطوات الواجب اتخاذها لإنتاج حليب نظيف فهي:

1- منع ظهور الميكروبات الممرضة بالحليب.
2- تقليل المحتوى البكتيري للحليب.
3- منع تكاثر الميكروبات الموجودة بالحليب.
4- إبادة الميكروبات الممرضة عند وجودها بالحليب.

إن الخطوة الأولى المتمثلة في منع ظهور الميكروبات الممرضة بالحليب، يتم تحقيقها من خلال الفحص المستمر لكل من الماشية والحلابين والعاملين في مجال إنتاج وتصنيع الحليب ومنتجاته واستبعاد المرضى منهم (وقد ذُكر ذلك في الصفحات السابقة)، أما الخطوات 2، 3، 4 فيتم تحقيقها من خلال الممارسات الجيدة التي تُجرى على الحليب الخام بعد حلبه، وفيما يلي عرض لتلك العمليات التصنيعية المتبعة بهدف الحصول على حليب نظيف صالح للشرب.

العمليات التصنيعية للحليب:-

تجرى على الحليب الخام بعد حلبه العديد من المعاملات قبل أن يصبح جاهزاً للاستهلاك أهمها عمليات الترشيح والتنقية والمعاملات الحرارية بهدف البسترة أو التعقيم. ويحب على المتخصص في ميكروبيولوجيا الألبان أن يلم بهذه العلميات لمواجهة أيه مشاكل تصنيعية أو تلوث للمنتج خلال أيه مرحلة من مراحل التصنيع.

تجميع الحليب و تبريده و نقله:

تعد عملية تجميع الحليب و تصفيته و تبريده و نقله من أهم العوامل التي قد تؤدي إلى تلوث الحليب ومن ثم فساده لذلك يلزم اتخاذ كافة الاحتياطات لمنع تلوث الحليب خلال تلك الفترة الحرجة وحتى وصوله إلى أماكن معالجته حرارياً أو تصنيعه. وينقل الحليب من مكان الحلب مباشرة إلى حجرة الحليب حيث يجمع ويصفى لإزالة الشوائب والأتربة الموجودة فيه ثم يبرد كما تجري له عمليات الوزن والتسجيل.

تصفية الحليب:

يقصد بعملية التصفية إزالة الشوائب والأتربة و الأوساخ المرئية التي سقطت في الحليب أثناء عملية الحلابة. ويفضل استخدم مصافٍ معدنية لها مرشحات قطنية لتصفية الحليب ولا

ينصح باستخدام الشاش أو القماش، ولكن عند استخدامه يجب الاهتمام بغسله و تعقيمه في حالة إعادة استعماله، وتُجرى عملية التصفية بعد الحلابة مباشرة بينما يكون الحليب دافئاً خوفاً من تجمع حبيبات الدهن مكونة طبقة من القشدة يمكن حجزها عند إجراء عملية التصفية.

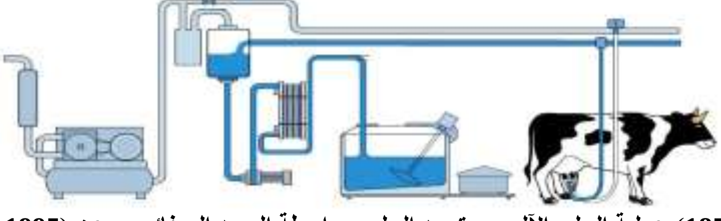
تبريد الحليب:

إن عملية تبريد الحليب لا تقضي على الأحياء المجهرية فيه ولكنها توقف نشاطها وتكاثرها ولاسيما التبريد المفاجئ ذلك لان الأحياء المجهرية تتكاثر في درجات الحرارة الاعتيادية أكثر بكثير من تكاثرها في درجات الحرارة المنخفضة، وهذا ما يتضح من الجدول التالي، ويبرد الحليب بعد الحلب مبكراً كلما أمكن ذلك على الرغم من أن الحليب له تأثير بدائي لوقف نمو الميكروبات ونشاطها حيث يظل ذلك لتأثير عدة ساعات بعد الحلب (خاصية الحليب المطهرة) وقد تطول المدة تصل إلى 24 ساعة إذا حفظ الحليب تحت درجة حرارة منخفضة. وتعتمد درجة الحرارة التي يجب تبريده عندها في المزرعة على طول الفترة الزمنية التي تمر منذ الحلب حتى تسليم الحليب لمحطة الحليب أو ومركز تجمع الحليب حيث يمكن أن تتفاوت تلك الفترة بين عدة ساعات ويومين إذا ما تم حفظ الحليب بكميات كبيرة في خزانات مبردة ويفضل تبريد الحليب لدرجة حرارة أقل من 10°م في خلال ساعة واحدة بعد عملية الحلابة. ويجب أن تكون تجهيزات التبريد المستعملة خالية من الشقوق والزوايا الحادة وسهلة النظافة والصيانة وفي حالة جيدة.

جدول رقم (41): يوضح علاقة درجة حرارة الحليب بنمو البكتيريا فيه.

درجة حرارة الحليب °م	عدد البكتيريا/مل خلال 24 ساعة من الحلب
صفر	2,400
4	2,500
10	11,000
16	180,000
20	450,000
30	1,400,000
35	25,000,000

الشكل التالي يوضح عملية الحلب الآلي مع تبريد الحليب بواسطة المبرد الصفائحي (Plate cooler) وهذه الطريقة هي الطريقة الأمثل وخصوصاً في حالة المزارع الكبيرة.



الشكل رقم (185) عملية الحلب الآلي مع تبريد الحليب بواسطة المبرد الصفائحي، عن (Bylund, 1995).

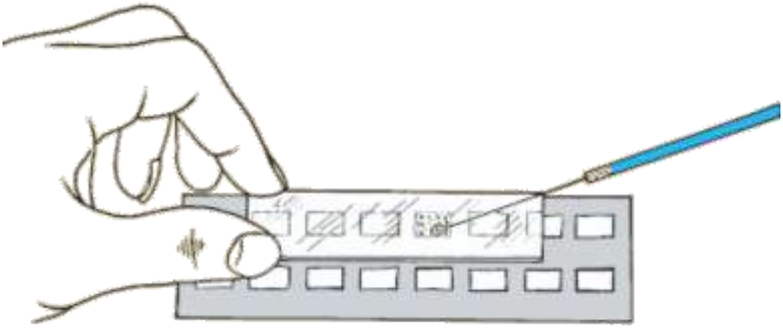
استلام الحليب Milk receiving:

يتضمن قسم الاستلام في معمل الألبان المتطور جميع المؤهلات اللازمة لغرض تفريغ الحليب وغسل وتطهير خزانات السيارات الحوضية التي تقوم بنقل الحليب من مركز إنتاجه (المزرعة) أو مركز بيعه (مركز جمع الحليب) إلى معمل التصنيع يوميا أو حسب الحاجة لما له علاقة بطاقة مركز جمع الحليب أو المزرعة ومعمل التصنيع ونوعية الحليب المخزون. وفي قسم الاستلام تُجرى على الحليب المُستلم العديد من الفحوصات بهدف تقدير جودته وصلاحيته للعمليات التصنيعية التالية ومن أهم فحوصات الاستلام التي تُجرى على الحليب الخام تلك الفحوصات التي تهدف إلى الكشف عن غش الحليب (خصوصاً عندما لا ينتج في المزرعة التابعة للمصنع) وتتمثل هذه الفحوصات في تقدير الوزن النوعي للحليب (وهو ما تم الإشارة إليه سابقاً) إضافة إلى تقدير نقطة تجمد الحليب، حيث أن غش الحليب بإضافة الماء يؤدي إلى ارتفاع درجة تجمده، حيث تختلف نقطة تجمد الحليب عن نقطة تجمد الماء فحين يتجمد الماء عند درجة حرارة الصفر المئوي يتجمد الحليب عند (-0.55°م) في مدى يتراوح بين (-0.53°م) إلى (-0.56°م) ويرجع الانخفاض في درجة تجمد الحليب إلى مكوناته الذائبة كسكر اللاكتوز وبعض العناصر المعدنية أما الدهون والبروتينات فليس لها تأثير على نقطة تجمد الحليب. ولان التغير في نسبة اللاكتوز والعناصر المعدنية في الحليب قليل جداً، لذلك فإن درجة تجمد الحليب تكاد تكون ثابتة، وبناءً على ذلك فقد استعملت نقطة تجمد الحليب لغرض التعرف على غش الحليب بإضافة الماء، حيث لوحظ أن إضافة الماء بنسبة 1 % حجماً إلى الحليب يؤدي إلى ارتفاع درجة تجمده بمقدار (0.0055°م)، لكن يجب أن يؤخذ في الاعتبار أن ارتفاع حموضة الحليب تتسبب بانخفاض درجة التجمد كذلك إضافة المواد الحافظة وذلك للارتفاع النسبي بنسبة المواد الذائبة. ولتقدير نقطة تجمد الحليب نستخدم جهاز مقياس درجة التجمد Cryoscope، ويمكن معرفة نسبة الماء المضاف إلى الحليب من خلال المعادلة التالية: نسبة الماء المضاف =

$$\frac{(-0.55 - \text{درجة تجمد الحليب المضاف إليه الماء}) \times 100}{-0.55}$$

كذلك تُجرى عدد من الفحوصات التي تهدف إلى تقييم الجودة الميكروبيولوجية للحليب الخام ومن أمثلة هذه الفحوصات اختبار الكشف عن التهاب الضرع وتقدير أعداد البكتيريا في الحليب الخام بطرق مختلفة منها طريقة العد المجهري المباشر DMC التي تعتبر أسرع الطرق لتقدير أعداد البكتيريا في الحليب وأساس هذه الطريقة يكمن في تصبيغ وعد البكتيريا الموجودة في حجم معين من عينة الحليب بعد فردها على مساحة محددة. حيث يتم في هذه الطريقة يتم أخذ 0,01 مليلتر من عينة الحليب المراد فحصه بواسطة لوب قياسي أو ماصة مخصصة (ماصة

شعرية 0,01 مليلتر) ثم تنشر هذه الكمية من الحليب على شريحة زجاجية في مساحة محددة تساوي 1 سم^2، وللمساعدة على ذلك توضع شريحة زجاجية على ورقة او كارت مرسوم عليها مربع أو مجموعة من المربعات مساحة كل منها 1 سم^2، ثم يتم توزيع عينة الحليب (0,01 مليلتر) ونشرها في هذه المساحة. وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الشكل رقم (186) يوضح نشر كمية 0,01 مليلتر من الحليب في مساحة 1سم^2 على شريحة زجاجية، عن (Benson, 2001).

تترك الشريحة لكي تجف ثم توضع في الزيلول لمدة دقيقة واحدة لغرض إزالة دهن الحليب وبعدها تغسل وتجفف، بعدها توضع الشريحة الجافة في كحول إيثيلي 95 % لمدة 30 ثانية ثم تغسل وتجفف، وأخيراً تصبغ الشريحة بصبغة أزرق الميثيلين لمدة دقيقة واحدة ثم تغسل وتجفف، وتفحص تحت العدسة الزيتية الكبرى. ويتم عد البكتيريا في عدد من الحقول المجهرية تتراوح بين 25 إلى 30 حقل مجهري ثم يتم حساب متوسط أعداد البكتيريا في الحقل المجهري الواحد ومن ثم نحسب أعداد البكتيريا في عينة الحليب بعد معرفتنا لمساحة الحقل المجهري وعدد الحقول المجهرية في المساحة المنشورة على الشريحة.

ويتم تقدير مساحة الحقل المجهري الواحد بواسطة شريحة ميكرومترية من خلال معرفة قطر الحقل المجهري (وعادة عند استخدام العدسة الزيتية فإن قطر الحقل يتراوح بين 0,14 – 0,16 مليمتر). ويمكن ايجاد مساحة الحقل المجهري من القانون (ط نق^2). إذاً مساحة الحقل المجهري = ط نق^2 = 3,1416 × (0,08 مليمتر)^2 = 0,02 مليمتر^2.

وبما أن كمية الحليب المراد تقدير أعداد البكتيريا فيه بهذه الطريقة منشورة على مساحة مقدارها 1 سم^2، فينبغي معرفة عدد الحقول المجهرية في هذه المساحة، وقبل ذلك ينبغي تحويل مساحة الحقل المجهري من المليمترات المربعة إلى السنتيمترات المربعة لتوحيد الوحدات، وبذلك فإن مساحة الحقل المجهري = 100 ÷ 0,02 = 0,0002 سم^2.

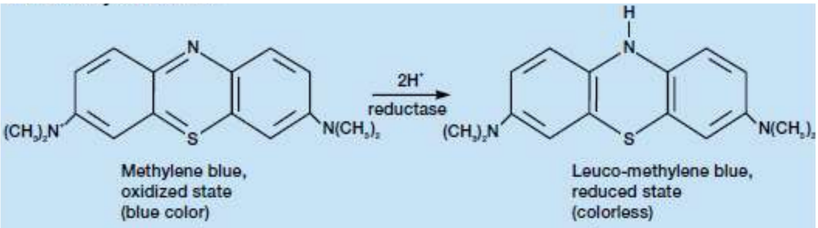
إذن عدد الحقول المجهرية في مساحة 1 سم^2 = 1 ÷ 0,0002 = 5000 حقل مجهري.

ولنفرض هنا أن متوسط أعداد البكتيريا في الحقل المجهري الواحد بعد فحص عدد من الحقول المجهرية تتراوح بين 25 إلى 30 حقل، كان 2 خلية بكتيرية.

إذن أعداد البكتيريا في عينة الحليب (0,01 مليلتر) المنشورة على مساحة مقدارها 1 سم^2 = 2 × 5000 = 10000، وبالتالي فإن أعداد البكتيريا في 1 مليلتر من عينة الحليب = 100 × 10000 = 1000000 أو 1 × 10^6 خلية / مليلتر.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة الحصول على نتائج فورية بأبسط التجهيزات، كما يمكن من خلالها معرفة الأشكال المورفولوجية للبكتريا للتعرف على أنواعها وبالتالي مصدرها، إضافة إلى تمكننا من الاحتفاظ بالشرائح المصبوغة لفترة طويلة وإعادة فحصها إذا تطلب الأمر ذلك. أما أهم ما يعاب على هذه الطريقة عدم التمييز بين البكتريا الحية والميتة في العينة المفحوصة إضافة إلى عدم الدقة في أخذ كمية العينة التي تكون صغيرة جداً (0,01 مليلتر)، كما أن بعض أجناس البكتيريا قد لا تكتسب الصبغة وبالتالي فلن يتم حسابها ضمن الحمولة البكتيرية للعينة.

وكذلك هناك طريقة اختزال الصبغات (كأزرق المثيلين والريزازورين Resazurin) التي تعتمد فكرتها على أنه كلما زادت أعداد البكتيريا النشيطة في الحليب فإنها تستهلك كمية أكثر من الأكسجين وبذلك يتم اختزل لون تلك الصبغات في وقت أسرع. وكما يتضح من المعادلة التالية تحول أزرق الميثيلين بلونه الأزرق في الحالة المؤكسدة إلى أزرق الميثيلين عديم اللون في الحالة المختزلة.



وفي طريقة اختزال صبغة أزرق الميثيلين يوضع 10 مليلتر من عينة الحليب المراد فحصها بواسطة ماصة معقمة في انبوبة اختبار معقمة ذات غطاء مطاطي محكم ويضاف عليها 1 مليلتر من صبغة أزرق الميثيلين ثم تغلق الانبوبة وتخلط 3 مرات بهدوء وبدون رج تحاشياً لإضافة كميات من الهواء، ثم توضع الأنبوبة في حمام مائي على درجة 37°م ويلاحظ اختفاء اللون كل ربع ساعة ويعتبر اختزال اللون الأزرق كاملا حينما يكون $\frac{4}{5}$ لون الحليب في الأنبوبة قد تغير.

وتقسم درجات جودة الحليب الميكروبية حسب اختبار اختزال صبغة أزرق الميثيلين إلى:

1- حليب ممتاز لا يختزل اللون في 8 ساعات.

2- حليب جيد يختزل اللون في أقل من 8 ساعات وأكثر من 6 ساعات.

3- حليب متوسط يختزل اللون في أقل من 6 ساعات وأكثر من ساعتين.

4- حليب رديء يختزل اللون في أقل من ساعتين.

ومن أهم مميزات هذه الطريقة سهولة إجراءها، كما يمكن فحص عدد كبير من العينات في نفس الوقت. لكن أهم ما يعاب على هذه الطريقة أن سرعة اختزال اللون ليست واحدة لكل أنواع البكتيريا، كما أن درجة الحرارة المستخدمة في التحضين 37°م ليست الدرجة المناسبة لنشاط جميع أنواع واجناس البكتيريا، إضافة إلى أن الحليب الطازج المحلوب للتو قد يحتاج على الأقل 10 ساعات لكي يختزل فيه لون الصبغة.

أما اختبار الريزازورين فهو نفس فحص أزرق الميثيلين لكن وجه الاختلاف يكمن في أن النتيجة المتحصل عليها منه تكون أسرع. حيث توضع 10 مليلتر من عينة الحليب المراد فحصها بواسطة ماصة معقمة في انبوبة اختبار معقمة ذات غطاء مطاطي محكم ويضاف عليها 1 مليلتر من صبغة الريزازورين ثم تغلق الانبوبة وتخلط 3 مرات بهدوء وبدون رج تحاشياً لإضافة كميات من الهواء، ثم توضع الأنبوبة في حمام مائي على درجة 37°م ويلاحظ اللون بعد ساعة من التحضين. يتم تقدير اللون الناتج في عينة الحليب وذلك باستعمال الأقراص الخاصة باختبار بالريزازورين. إن لون صبغة الريزازورين يكون أزرق وعند الاختزال يتغير اللون حتى يصل للون الأبيض كما يلي:

اللون بعد ساعة على درجة 37°م		الرقم على القرص	درجة جودة الحليب
أزرق	Blue	6	صالح
بنفسجي فاتح	Lilac	5	صالح
بنفسجي براق	Mauve	4	صالح
وردي بنفسجي	Pink- mauve	3	متوسط
بنفسجي وردي	Mauve- pink	2	متوسط
وردي	Pink	1	متوسط
أبيض	White	صفر	رديء غير صالح

وهناك طريقة العد القياسي بالأطباق (SPC) التي يتم فيها إعداد تخفيفات عشرية من عينة الحليب المرد فحصه ويتم زيادة عدد التخفيفات حسب درجة تلوث الحليب، ومن أهم مميزات هذه الطريقة أنها تعطي فكرة صحيحة عن عدد البكتيريا الحية في الحليب بعكس طريقة العد المجهري المباشر DMC للبكتريا التي لا تميز بين البكتريا الحية والميتة في العينة المفحوصة. لكن أهم ما يعاب على هذه الطريقة هو عدم نمو جميع البكتريا على الوسط الغذائي، إضافة إلى كثرة الأدوات والتجهيزات المستعملة التي تحتاجها هذه الطريقة.

وهناك اختبارات ميكروبيولوجية أخرى تُجرى على الحليب الخام كتقدير أعداد بكتيريا القولون والبكتيريا المتحملة للبرودة (وخصوصاً في المصانع التي تُنتج الحليب المبستر) وتقدير أعداد البكتيريا المقاومة للحرارة وكذلك الكشف عن متبقيات المضادات الحيوية في الحليب الخام، فقد يحتوي الحليب على بعض المضادات الحيوية إذا كان ناتجا من حيوانات عولجت بتلك المضادات الحيوية، مما يؤدي إلى الحد من نشاط بكتريا البادئ عند تصنيع الجبن والألبان المتخمرة، لذلك لا بد من استبعاد حليب هذه الحيوانات لمدة لا تقل عن ثلاث إلى أربع أيام بعد انتهاء فترة العلاج لضمان خلو الحليب الناتج من المضادات الحيوية.

وهناك عدة طرق للكشف عن بقايا المضادات الحيوية في الحليب الخام، وفي أحدى هذه الطرق يتم تنمية بكتيريا *Bacillus subtilis* في بيئة غذائية صلبة حاوية على كبريتات المنجنيز (300 مليجرام/لتر) عند 37°م لمدة 5 أيام ثم تعلق المزرعة في محلول الملح الفسيولوجي المعقم وتركز الجراثيم بالطرد المركزي وإعادة التعليق في محلول الملح الفسيولوجي ثم يسخن المعلق عند 70°م لمدة 30 دقيقة ويحفظ في الثلاجة، تقدر كمية المعلق اللازم إضافتها لكل 100 مليلتر من الأجار لإعطاء أنسب نمو عن التحضين عند 37°م لمدة 2,5 - 3 ساعات.

كما يحضر محلول منظم معقم من الفوسفات رقمه الهيدروجيني 6 وتركيزه 1 % وذلك بإذابة 2 جرام فوسفات ثنائي البوتاسيوم و 8 جرام فوسفات أحادي البوتاسيوم في لتر ماء مقطر ويحضر منه معلق بنسلين يحتوي على 100 وحدة مليلتر ويحفظ في الثلاجة لمدة لا تزيد على يومين، يمكن استعمال الماء بدلاً من المحلول المنظم.

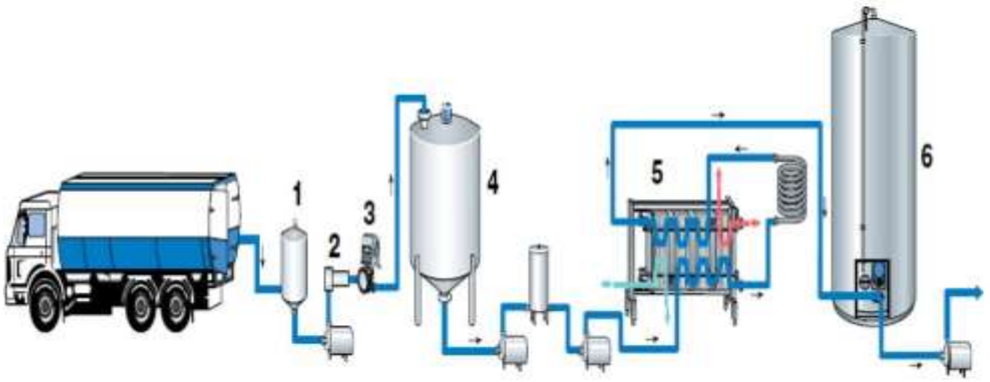
وفي هذه الطريقة تجهز أطباق الاختبار بواسطة بيئة الآجار الملقحة بالكمية المضبوطة من المعلق الجرثومي على أن تكون درجة حرارة البيئة 55 - 60°م عند إضافة الجراثيم إليها ويتم ذلك بوضع 10 مليلتر من بيئة الآجار الملقحة في كل طبق من أطباق بتري باستخدام ماصة معقمة ثم يوزع الآجار بالتساوي في الطبق ويغطى بغطاء خزفي أو معدني ويترك الآجار ليتماسك. تحفظ الأطباق في ثلاجة لمدة 3 أيام إلى 5 أيام، يخرج كل طبق من الثلاجة حسب الحاجة على أن يستخدم خلال 15 دقيقة من نقله من الثلاجة.

يوضع بواسطة ملقط معقم في أحد الأطباق قرص مقارنة يحتوي على 0,05 وحدة بنسلين ويوضع في طبق آخر قرص مقارنة يحتوي على 0,1 وحدة. ترج عينة الحليب المراد اختبارها جيدًا ثم تغمر فيها تمامًا ورقة ترشيح بواسطة ملقط ثم تسحب وتهز الورقة للتخلص من الحليب الزائد ثم توضع على سطح الآجار ويضغط عليها بخفة بواسطة ملقط للتأكد من ملامسة الورقة لأسطح الآجار مع مراعاة عدم الضغط بشدة.

تحضن جميع الأطباق المستعملة عند 37°م لمدة تتراوح بين 2,5 - 3 ساعات، تفحص الأطباق بعد ذلك لتحديد المناطق التي تم فيها تثبيط النمو البكتيري وذلك بمساعدة مصدر ضوء. يدل وجود مناطق بكتيرية التثبيط على وجود بنسلين أو أي مادة أخرى مضادة النمو البكتيري.

<u>أمـا فـي الطريقـة الأخـرى</u> فيـتم أخـذ 100 مليلتـر مـن الحليـب المـراد الكشـف عـن بقايـا المضادات الحيوية فيه وتتم بسترته علي درجة حرارة 80°م درجة مئوية لمدة 10 دقائق في حمام مـائي يبـرد بعـدها لدرجـة 42°م ويلقـح بمزرعـة البـادئ النشـطة بنسـبة 3 – 5 % ويحضـن فـي حضانـة درجة حرارتـها 42°م لمـدة ثـلاث سـاعات تقريبـاً بعـدها يتم تحديد طبيعـة الخثـرة المتكونـة فإذا أعطى خثره صلبة متماسكة تظهر خـلال مـدة ثـلاث سـاعات فهـذه دلالـة علـى خلـوه مـن بقايـا المضادات الحيوية، أما إذا كانت الخثرة ضعيفة أو لم تتكون أي خثـرة فهـذا دلالـة علـى وجـود بقايـا المضادات الحيوية في عينة الحليب المفحوصة بهذه الطريقة.

وبعد أن يُقبل الحليب الخـام فـي قسم الاستلام يـتم نقلـه إلـى الأقسـام الأخـرى فـي المصنع تمهيـداً لإجراء المعاملات الحرارية له. والشكل التالي يوضح إجمالي العمليات التي يمر بهـا الحليب الخـام منذ وصوله للمصنع من المزارع أو مراكز أو محطات التجميع عن طريـق السيارات الحوضية المبردة إلى حين تخزينه في صهاريج تمهيداً لتعبئته أو تصنيعه إلى منتجات لبنية مختلفة.

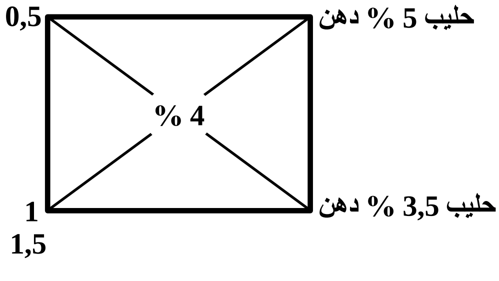


1- وحدة إزالـة الهـواء، 2- مرشح، 3- عداد الحليب، 4- خزان مؤقت، 5- المبادل الحراري (تسخين/تبريد أو تبريد فقط)، 6- صِهريج التخزين.

الشكل رقم (187) يوضح العمليات التي يمر بها الحليب الخام منذ وصوله للمصنع إلى حين تخزينه، عن (Bylund, 1995).

<u>الخزن والتعديل Storage and standardization:</u>

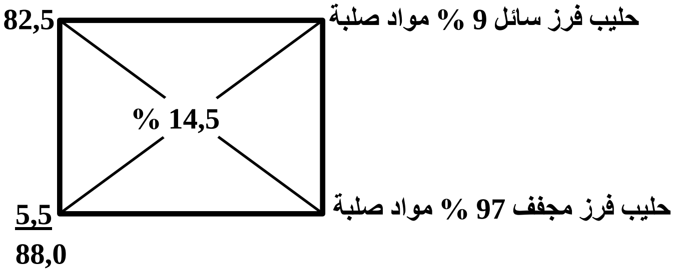
يصفى الحليب بارداً ثم يضخ إلى الخزانات أو الصهاريج للحفظ، ويجب أن يحتوي خزان حفظ الحليب على خلاط لغرض خلط أو مزج الحليب قبل عملية أخذ النماذج لتقدير نسبة الدهن وبالتالي تقدير الكمية اللازمة لغرض عملية التعديل. يراعى خلط الحليب بشكل جيد داخل خزان الحفظ قبل أن يضخ إلى جهاز البسترة. وفي حالة الحاجة إلى عملية التعديل تضاف كميات مناسبة من القشدة الطازجة أو الحليب الفرز الطازج إلى الخزان للوصول إلى نسبة الدهن المرغوبة أو إضافة كمية من الحليب الفرز المجفف لرفع المواد الصلبة اللادهنية للحليب. ويفضل عمل فحص للحليب المعدل لغرض التأكد من دقة عملية التعديل. وتستعمل عادة طريقة مربع بيرسن Pearson square في معرفة نسبة المواد المختلفة المراد استعمالها في عملية التكيف. وفي هذه الطريقة يرسم أولاً مربع وتوضع نسبة الدهن المرغوبة للمنتج في مركز المربع، فمثلاً عندما يرغب أن تكون نسبة الدهن في الحليب 4 % فإن الرقم 4 يوضع في مركز المربع. فإذا استعمل حليب نسبة الدهن فيه 5 % وحليب نسبة الدهن فيه 3.5 % في تحضير هذا الحليب فتوضع الأرقام 5 و 3.5 في الزاويتين العليا والسفلى اليُسرى للمربع، بعدها ترسم خطوط لتوصيل الزوايا المتقابلة مع بعضها، ثم تجرى عملية الطرح بين الأرقام الموجودة على يسار المربع والرقم في مركز المربع باتجاه خطوط تقاطع المربح المرسومة ويوضع الفرق على الزاويتين يمين المربع كما هو في الشكل التوضيحي أدناه. وبذلك يمزج نصف جزء من الحليب الذي نسبة الدهن فيه 5 % مع جزء واحد من الحليب 3.5 % دهن لإنتاج حليب نسبة الدهن فيه 4 %.



أي أنه لإنتاج 1,5 جزء حليب نسبة الدهن فيه 4 %، علينا مزج نصف جزء من الحليب الذي نسبة الدهن فيه 5 % مع جزء واحد من الحليب 3,5 % دهن. وبالتالي فإذا ما أردنا أنتاج 1000 كيلوجرام من الحليب 4 % دهن، فإن كمية الحليب 5 % دهن = $\frac{1000 \times 0,5}{1,5}$ = 333,33 لتر والحليب 3,5 % دهن = $\frac{1000 \times 1}{1,5}$ = 666,67 لتر وبالتالي نحصل 1000 كجم حليب 4 % دهن.

وفيما يلي أمثلة أُخرى على عمليات التكييف والتعديل للحليب لغرض استخدامه لتصنيع منتجات متنوعة من منتجات الألبان المختلفة في نسبة الدهن والمواد الصلبة اللادهنية.

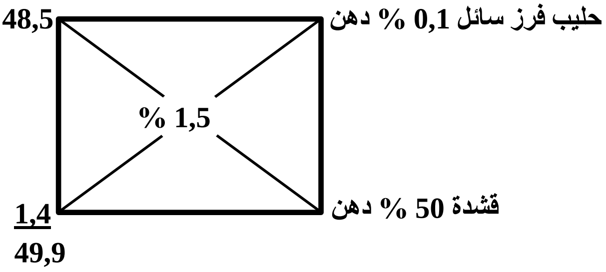
المثال الأول: يهدف إلى تحضير كمية 500 لتر حليب نسبة المواد الصلبة الكلية فيه 14.5 % من حليب فرز سائل نسبة المواد الصلبة الكلية فيه 9 % و حليب فرز مجفف نسبة المواد الصلبة الكلية فيه تبلغ 97 %.



كمية الحليب الفرز السـائل (9 % مواد صلبة) = $\frac{500 \times 82,5}{88}$ = 468,75 لتر

كمية الحليب الفرز المجفف (97 % مواد صلبة) = $\frac{500 \times 5,5}{88}$ = 31,25 لتر

المثال الثاني: يهدف إلى تحضير كمية 500 لتر حليب نسبة الدهن فيه 1.5 % من حليب فرز سائل نسبة الدهن فيه 0.1 % و قشدة نسبة الدهن فيها 50 %.

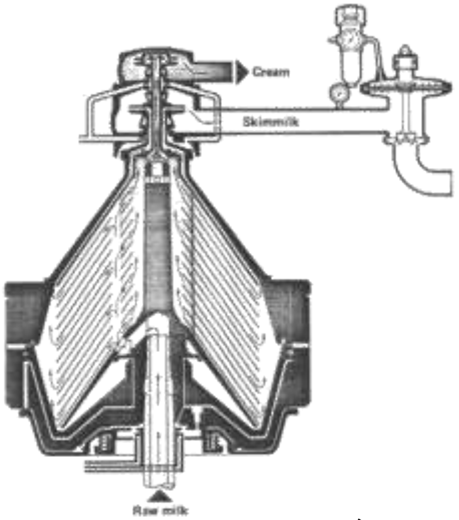


كمية الحليب الفرز السـائل (0,1 % دهن) = $\frac{500 \times 48,5}{49,9}$ = 485,97 لتر

كمية القشدة (50 % دهن) = $\frac{50 \times 1,4}{49,9}$ = 14,03 لتر

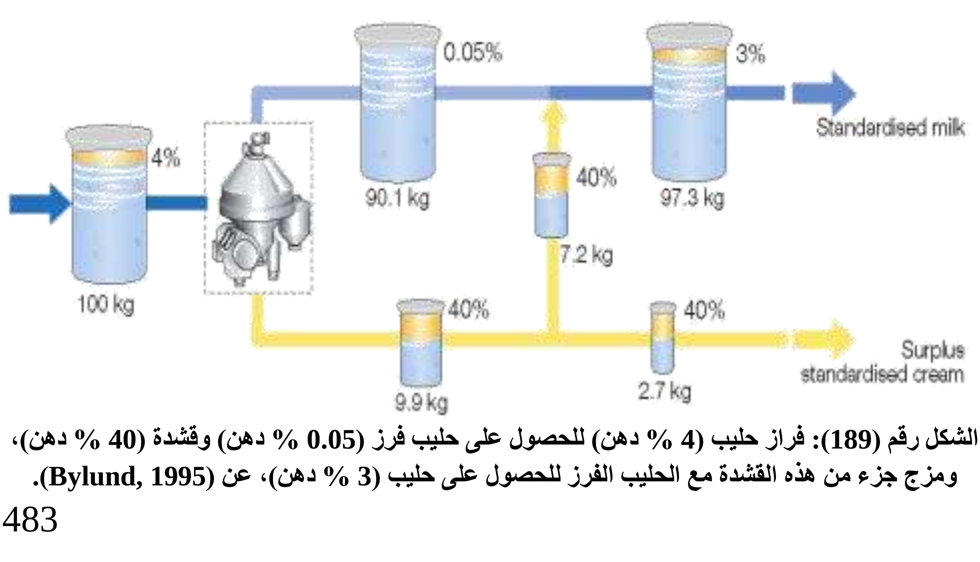
أي أنه لإنتاج 500 لتر حليب (1.5 % دهن) يتم خلط 485,97 لتر من الحليب الفرز السائل (0.1 % دهن) + 14,03 لتر من القشدة (50 % دهن) = 500 لتر حليب (1.5 % دهن).

ويستخدم في عملية التعديل أنواع من الحليب مختلفة في نسبة الدهن وكذلك القشدة وكلٍ من الحليب الفرز بشكليه السائل والمجفف، ويمكن الحصول على الحليب الفرز والقشدة بواسطة جهاز يعرف بالفراز.



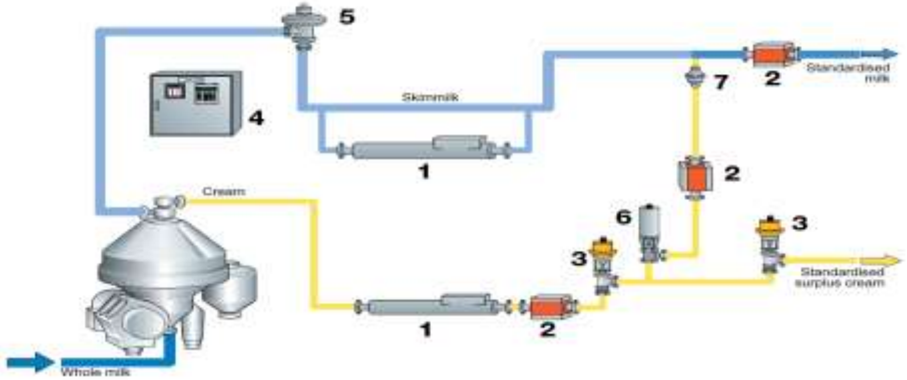
الشكل رقم (188) الفراز المستخدم في الحصول على الحليب الفرز والقشدة، عن (Bylund, 1995).

والشكل التالي يوضح فراز 100 كيلو جرام من الحليب الذي نسبة الدهن فيه 4 %، نحصل منها على 90.1 كيلو جرام من الحليب الفرز (0.05 % دهن) و 9.9 كيلو جرام من القشدة (40 % دهن)، ووفقاً لحسابات تعديل (تكييف) الحليب باستخدام مربع بيرسن Pearson square تم مزج جزء من هذه القشدة (7.18 كيلوجرام) مع الحليب الفرز (90.12 كيلوجرام) للحصول على (97.3 كيلوجرام) من الحليب الذي نسبة الدهن فيه 3 %، بالإضافة إلى كمية (2.7 كيلوجرام) من القشدة (40 % دهن).



الشكل رقم (189): فراز حليب (4 % دهن) للحصول على حليب فرز (0.05 % دهن) وقشدة (40 % دهن)، ومزج جزء من هذه القشدة مع الحليب الفرز للحصول على حليب (3 % دهن)، عن (Bylund, 1995).

والشكل التالي يوضح عملية الحصول على الحليب الفرز والقشدة من الحليب الكامل الدسم:



(1) ناقل اللزوجة، (2) ناقل التدفق، (3) صمام تحكم، (4) لوحة تحكم، (5) صمام الضغط المنتظم، (6) صمام التوقف، (7) صمام كبح.

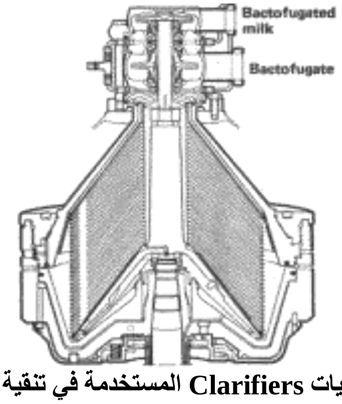
الشكل رقم (190) عملية الحصول على الحليب الفرز والقشدة، عن (Bylund, 1995).

<u>الترشيح Filtering:</u>

يختلف الحليب الوارد إلى مصنع الألبان من مصادر عديدة في صفاته ولا يمكن عندئذ لصاحب المصنع أن يتحكم في نظافة الحليب المنتج. لذا يجب أن يمر الحليب خلال مصفى قبل بسترته لإزالة الأوساخ المرئية. ومن الطبيعي أنه لا يمكن إزالة الأوساخ الذائبة بل تستوجب الظروف الصحية منع الأوساخ من الدخول إلى الحليب بقدر الإمكان. ويمرر بعض المنتجين الحليب الذي ينتجونه على مصفى معدني أو مرشح قطني قبل تبريده. و قد حلت عملية تنقية الحليب البارد محل معظم طرق الترشيح التي اتبعت واستعملت في معامل تصنيع الحليب السائل.

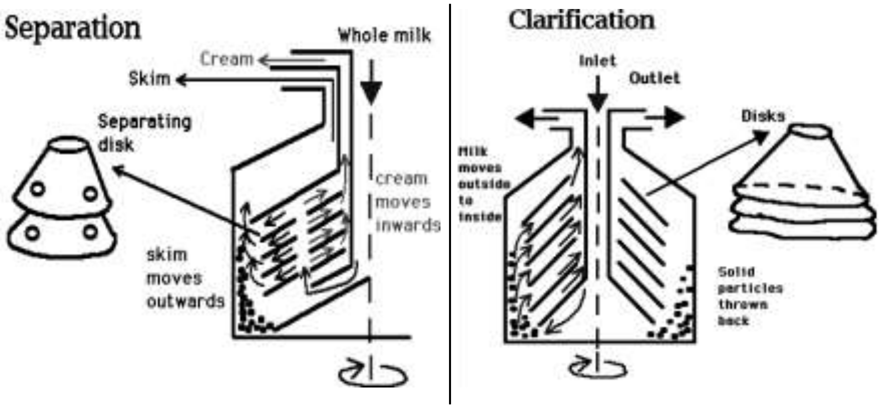
<u>التنقية Clarifying:</u>

تشبه المنقيات أجهزة فرز الحليب في مظهرها وعملها. وتختلف فقط في الشكل حيث يخرج الحليب من الجهاز خلال فتحة واحدة بدلا من اثنين كما في حالة الفراز حيث يستعمل أحدهما لخروج القشدة والأخر لخروج حليب الفرز كما يتضح من الشكل التالي:



الشكل رقم (191) يوضح أحد المنقيات Clarifiers المستخدمة في تنقية الحليب، عن (Bylund, 1995).

والشكل التالي يوضح الفروق بين عملية الفرز بواسطة جهاز الفراز وعملية التنقية بواسطة المنقي **Clarifiers** و الفروق الأساسية بين كلا الجهازين.



الشكل رقم (192) يوضح الفروق الأساسية بين عملية الفرز وعملية التنقية للحليب، عن (Goff, 2008).

عند تنقية الحليب تزال الشوائب والأوساخ بواسطة قوة الطرد المركزي إذ تزال الأوساخ والخلايا إلى الجزء الخارجي من المحور، حيث تلتصق بالمعان وتكون طبقة هلامية مشابه للطبقة التي تتكون في مخروط الفراز. وتتركب الأوساخ الخارجية من الحليب بواسطة المنقى من بروتين، خلايا الدم البيضاء، أجزاء من الخلايا الإفرازية من الضرع، الدهن، فوسفات الكالسيوم الرماد والبكتيريا وأحيانا خلايا الدم الحمراء. وتتأثر كمية الأوساخ بكمية المواد الغريبة وحالة الضرع، موسم الإدرار، عدد البكتيريا وحموضة الحليب، ودرجة حرارة التنقية، وسرعة المنقى وكمية الحليب الداخلة إلى المنقى وطول مدة تشغيل المنقى. يؤدي طول مدة التشغيل الجهاز إلى تكوين طبقة مضغوطة من الأوساخ وأكثر جفافا. تميل كمية الأوساخ إلى الزيادة في حالة إصابة الضرع وفي أول مواسم الحليب وفي نهايتها وزيادة عمر وحموضة الحليب.

وقد أشير إلى قلة عدد البكتيريا المرضية في الحليب بعد تنقيته وأن الحليب المنقى يعتريه تخمراً لاكتيكياً إذا ما قورن بالحليب غير المنقى الذي يحدث فيه تخمرات تعفنية. لقد وجد في بعض الدراسات أن البكتيريا التعفنية تخرج مع طبقة الأوساخ بدرجة كبيرة عن المجاميع الأخرى من البكتيريا وقد يكون لها أثر في تحديد نوع التخمر السائد وبذا تكون عملية التنقية ذات أهمية كبرى في صناعة الجبن.

المعاملات الحرارية Heat Treatments:

جميع المعاملات التصنيعية التي مر بها الحليب حتى الأن لا يمكن من خلالها أن نضمن سلامته وخلوه من الأحياء المجهرية المرضية كما لا يمكن أن تُكسبه قدرة على مقاومة التلف والاحتفاظ به لفترة زمنية ما، لذلك لابد من اجراء المعاملات الحرارية التي تحقق تلك الأهداف.

البسترة Pasteurization:

تتضمن عملية البسترة تسخين الحليب إلى درجة حرارة مناسبة ولمدة من لوقت تكفي للقضاء التام على الأحياء المجهرية المرضية، وعلى معظم الأحياء المجهرية الأخرى المتواجدة في الحليب ، ثم تبريد الحليب إلى درجة حرارية واطئة. تحدد القوانين في معظم بلدان العالم درجة الحرارة التي يلزم تسخين الحليب إليها والوقت الذي يبقى فيه على تلك الدرجة.

لسنين عديدة وحتى العام 1950م كان الحليب يُبستر عند درجة حرارة 61.6°م لمدة 30 دقيقة، و ذلك بهدف القضاء على الأحياء المجهرية المرضية والتي كان الميكروب المسبب لمرض السل *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *tuberculosis* أكثرها مقاومة حرارية، ولذا فإن الحليب يجب أن يعامل حرارياً للقضاء عليه، ولم يكن حينئذ يعرف أن الحليب يمكن أن ينقل مرض الحمى المجهولة query fever أو ما تسمى بحمى كيو (Q Fever) عندما يتلوث الحليب بالبكتيريا المسببة لها *Coxiella burnetii* ولكن هذه البكتيريا تقتل عند تسخين الحليب على درجة حرارة 62.8°م لمدة 30 دقيقة ولذلك فقد عُدلت التشريعات بعد ذلك التاريخ لتصل لهذه الدرجة والوقت. كما أن البسترة بمثل هذه الظروف إلى جانب أنها تقضي على جميع البكتيريا المرضية، فهي أيضاً تقضي على حوالي 90 – 99% من الأحياء المجهرية الموجودة في الحليب.

تأثير البسترة على المحتويات الميكروبية للحليب:

تؤدى عملية البسترة إلى القضاء على بكتيريا السل *Mycobacterium tuberculosis* وكذلك البكتيريا المسببة للحمى المجهولة query fever (Q Fever) *Coxiella burnetii* وهي أكثر الميكروبات المرضية مقاومة للحرارة وينتج عن ذلك بالتالي خلو الحليب المبستر من جميع أنواع الميكروبات المرضية الأخرى غير المتجرثمة، أما بالنسبة لتأثير حرارة البسترة على البكتيريا غير المرضية فهو غير تام ويتوقف على أنواعها حيث:

1- يُقضى على نحو 99.9 % فقط من بكتيريا حامض اللاكتيك حيث تتبقى بعض السلالات التي تقاوم حرارة البسترة.

2- يُقضى نهائيا على بكتيريا القولون التي تسبب إنتاج الحموضة والغازات في الحليب، ولذا فان وجود هذه الميكروبات في الحليب المبستر يدل في أغلب الأحيان على حدوث التلوث بعد انتهاء عملية البسترة ويكون مصدره عادة عدم نظافة المبردات أو جهاز التعبئة أو العبوات. وفي هذه الحالة يكون اختبار أنزيم الفوسفاتيز هو الفيصل في معرفة أن التلوث حدث بعد عملية البسترة أو أن وجود بكتيريا القولون في الحليب كان نتيجة عدم كفاءة عملية البسترة.

3- قد تتزايد أعداد بعض أنواع البكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة أثناء عملية البسترة.

4 - تتبقى بعد بسترة الحليب أنواع البكتيريا المتحملة للحرارة العالية حيث تتحمل حرارة التسخين، وهذه يكون مصدرها الرئيس بالحليب الخام تلوث أواني الحليب بالمزرعة.

5- يتبقى في الحليب المبستر أبواغ البكتيريا خصوصا من الجنس ***Bacillus*** وأهمها ***B. cereus*** ومصادر هذه أبواغ في الحليب الخام الأعلاف والحيوانات ومياه الغسيل والأواني. وينشأ عن وجودها في الحليب المبستر حدوث التجبن الحلو.

<u>طرق البسترة:</u>

هناك طريقتان شائعتا الاستعمال لبسترة الحليب والقشدة هما الطريقة البطيئة والطريقة السريعة. ويعرف الحليب ومنتجاته المبسترة قانونياً بأنه الحليب و منتجاته التي تم تسخين كل جزء منها إلى درجة حرارة 62.8°م على الأقل وإبقائها على هذه الدرجة أو أعلى لمدة لا تقل عن 30 دقيقة بالنسبة للطريقة البطيئة، أو تسخين كل جزء منها إلى درجة حرارة لا تقل عن 72°م وإبقاءه على هذه الدرجة أو أعلى لمدة لا نقل عن 15 ثانية بالنسبة للطريقة السريعة. أما المنتجات التي تحتوي على نسبة دهن أعلى من الحليب أو مضاف لها السكريات فيجب تسخينها على درجة حرارة لا تقل عن 66°م و إبقاءها على هذه الدرجة أو أعلى لمدة لا تقل عن 30 دقيقة بالنسبة للطريقة البطيئة أو على درجة حرارة 74.5°م و إبقائها على هذه الدرجة أو أعلى لمدة لا تقل عن 15 ثانية في البسترة السريعة. لقد ازداد استعمال طريقة البسترة السريعة للحليب السائل بصورة تدريجية خلال السنين الماضية ويقوم الكثير من المصنعين بتسخين الحليب إلى درجات حرارية أعلى من الدرجات الاعتيادية تصل إلى 73 - 77°م أو أعلى ولمدة تزيد عن 15 ثانية. وقد ينتج عن ذلك الطعم المطبوخ للحليب لكنه يختفي خلال الـ24 ساعة الأولى من التصنيع. هذا وأن الفائدة من استعمال الحرارة العالية هو رفع كفاءة البسترة في القضاء على الأحياء المجهرية وبالتالي زيادة صلاحية الحليب للاستهلاك شرط عدم السماح لتلوثه بعد البسترة، أما المنتجات اللبنية المضاف لها الدهن أو السكر أو الاثنين معا مثل حليب الشوكولاتة وخليط المثلجات القشدية فغالبا ما تسخن على درجة 80 - 88°م وإبقاءها على هذه الدرجة لمدة لا تقل عن 25 ثانية.

إن الحاجة إلى إطالة فترة بقاء المنتجات بحالة جيدة للاستهلاك وتسويقها في مناطق جغرافية متباينة في ظروفها المناخية بجانب التغيرات التي تحصل خلال عمليات التسويق كل هذه العوامل أوجبت الرغبة في التصنيع والتعبئة تحت ظروف صحية معقمة أو شبه معقمة. ونتيجة لذلك تطورت طريقة البسترة السريعة إلى طريقة المعاملة بالحرارة الفائقة (UHT) التي يتم فيها تصنيع المنتجات تحت ظروف صحية جيدة وغالبا تستعمل درجة حرارة تتراوح بين 88 - 132°م ولفترة لا تزيد عن ثانيتين وعند استعمال درجة حرارة أعلى من 132°م فعندئذ يتم تعقيم المنتجات بدلا من بسترتها، وهناك طرق متعددة وأجهزة مختلفة تستعمل في المعاملات الحرارية للحليب ومنتجاته سواء كانت بهدف البسترة أو التعقيم ولا يتسع المجال لذكرها جميعاً وبالطبع سوف يتم التركيز على أكثر هذه الطرق والأجهزة والمعاملات انتشاراً في الوقت الحاضر.

1- البسترة بالطريقة البطيئة Low Temperature Long Time:

تستعمل أجهزة عديدة في تسخين الحليب وإبقاءه على درجة حرارة البسترة للمدة المطلوبة، وأكثرها استعمالا أحواض أو خزانات البسترة. منها ما يتم فيها تسخين الحليب إلى الحرارة المطلوبة ثم إبقاءه على تلك الدرجة وللمدة المطلوبة بنفس الحوض. كما أن بعض الأجهزة الأخرى يتم تسخين الحليب بالطريقة الخاطفة Flash method إلى درجة حرارة 62.8°م أو أعلى ثم يذهب إلى حوض البسترة لإبقائه على هذه الدرجة خلال المدة اللازمة للبسترة. وتحتاج هذه العملية إلى 6 - 8 أحواض التي تملا وتفرغ باستمرار في عملية البسترة البطيئة المستمرة Continuous holding والتي كانت تستعمل في معامل الألبان الكبيرة قبل ظهور واستعمال طريقة البسترة السريعة.

غالبا ما يستعمل حوض البسترة لبسترة كميات قليلة من الحليب المراد تصنيعه حيث يتم تسخين الحليب إلى الدرجة الحرارية الملائمة وإبقاءه على هذه الدرجة في الحوض لمدة معينة يبرد بعدها باستعمال أجهزة أخرى. ونتيجة بقاء الحليب حوالي الساعة في الحوض فقد يظهر الطعم المطبوخ بصورة واضحة عند استعمال هذه الطريقة. وعند تدوير الماء المثلج خلال جدران الحوض لغرض تبريد الحليب المبستر تتوقف عملية تطوير نكهة الطعم المطبوخ للحليب. وهذا النوع من البسترة لا يستعمل حالياً إلا على نطاق ضيق في المعامل الصغيرة أو بعض مصانع الجبن أو المثلجات القشدية الصغيرة.

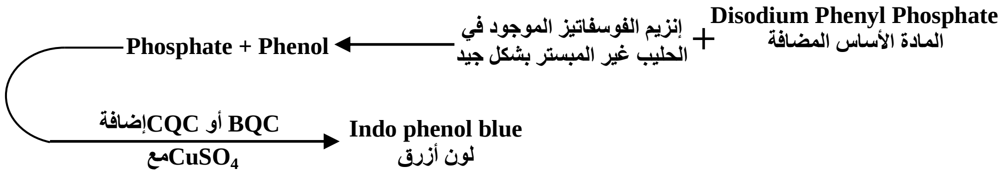
2- البسترة بالطريقة السريعة High Temperature short Time:

يسخن الحليب في هذه الطريقة إلى 71.5°م وإبقاءه لحظات ثم يعقبه تبريد سريع، وتعتبر هذه الطريقة قانونية إذا ما تم تسخين كل جزء من أجزاء الحليب أو منتجاته إلى 71.5°م على الأقل ولمدة 15 ثانية على الأقل في جهاز محكم.

للتأكد من كفاءة عملية البسترة للحليب، يخضع الحليب المبستر لاختبار يدعى اختبار الفوسفاتيز Phosphatase Test، حيث أن تحطم إنزيم الفوسفاتيز القلوي دليلاً على كفاءة هذه العملية في إبادة الأحياء المجهرية المرضية حيث أن القضاء على الأحياء المجهرية المرضية بضمنها بكتيريا السل *Mycobacterium tuberculosis subsp. tuberculosis* وبكتيريا الحمى المجهولة (query fever) *Coxiella burnetii* أسرع من دنترة أنزيم الفوسفاتيز خلال مدى معين من الحرارة وفترة معينة من الوقت ولذا فإن خلو الحليب من هذا الأنزيم يدل على خلوه من الأحياء المجهرية المرضية.

ويعتمد هذا الاختبار على تحطم إنزيم الفوسفاتيز الحساس للحرارة والذي يوجد بشكل طبيعي في الحليب الطازج نتيجة عملية البسترة، ويكشف عن وجود هذا الإنزيم اعتمادا على

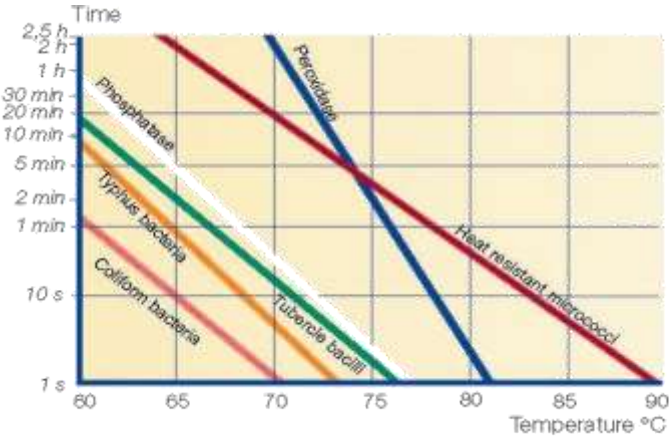
قابليته في تحرير الفينول من مادة **Disodium Phenyl Phosphate** المضافة إلى الحليب عند إجراء هذا الاختبار، في وجود مادة **2,6-dibromoquinone chloroimide (BQC)** أو مادة **2,6-dichloroquinone chloroimide (CQC)** مع إضافة كبريتات النحاس $CuSO_4$ حيث يتكون لون أزرق مع الفينول المتحرر من المادة الأساس في حالة وجود إنزيم الفوسفاتيز القاعدي **Alkaline Phosphatase** وذلك بسبب فعاليته في تحطيم المادة الأساس وتحرير الفينول كما في المعادلة التالية:



إن ظهور اللون الأزرق يعني احتواء الحليب على كمية من إنزيم الفوسفاتيز القاعدي **Alkaline Phosphatase** بسبب عدم بسترة الحليب أو عدم كفاءة عملية البسترة أو بفعل تلوث الحليب المبستر بأخر غير مبستر، ويمكن معرفة كمية الإنزيم الموجودة بقياس تركيز اللون الأزرق المتكون ومقارنته مع محلول قياسي يحتوي على كميات معلومة من الفينول المعامل بنفس المحاليل السابقة.

كذلك هناك طرق أُخرى مشابهة لمعرفة كفاءة عملية البسترة، ففي إحدى هذه الطرق يتم اختبار تحرر الفينولفثالين من مركب الـ **Disodium Phosphate Phenolphthalein** بفعل إنزيم الفوسفاتيز القاعدي **Alkaline Phosphatase**، حيث يتلون الحليب الخام بلون وردي فوراً أو بعد مرور عشر دقائق من عملية التحضين على درجة حرارة 37^oم (اللون الوردي ناتج من تحرر الفينولفثالين بفعل الإنزيم)، أما ظهور اللون الوردي بعد ساعة من عملية التحضين يدلل على أن عملية البسترة التي جرت للحليب كانت غير كافية، أو أن الحليب المبستر امتزج معه حليب خام، لان الحليب المبستر بصورة تامة لا يظهر عليه أي لون حتى بعد مرور ساعات طويلة من التحضين على درجة حرارة 37^oم. وكلا الطريقتين السابقتين يكون فيهما وسط التفاعل قاعدياً (pH 9 - 10)، ليتناسب مع الطبيعة القاعدية للإنزيم.

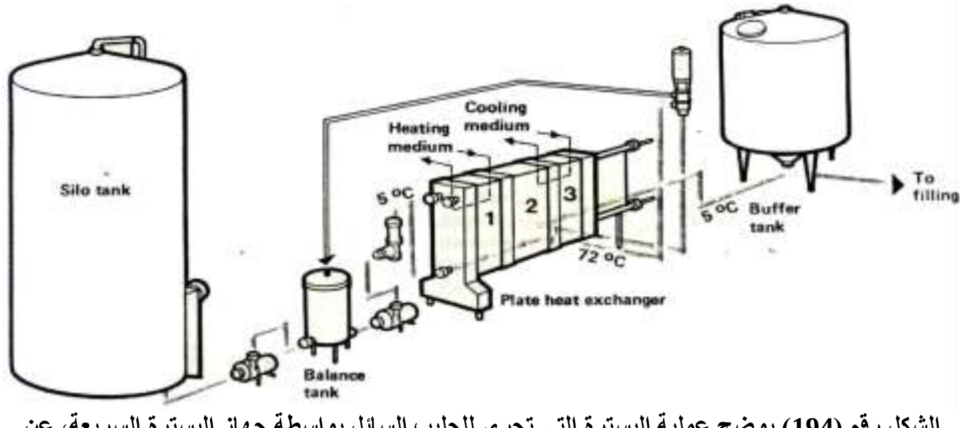
أما في حالة الحليب المعامل حرارياً لدرجة حرارة أعلى من 80^oم، فيستخدم إنزيم البيروكسيديز **Peroxidase** الذي يتدنتر على درجة حرارة 80^oم في الكشف عن كفاءة المعاملة الحرارية، وهذا ما يتضح من الشكل التالي والذي يبين تأثير المعاملات الحرارية المستعملة على بعض الأحياء المجهرية والإنزيمات الموجودة في الحليب.



الشكل رقم (193): يوضح تأثير المعاملات الحرارية على الأحياء المجهرية والإنزيمات الموجودة في الحليب، عن (Bylund, 1995).

لقد دلت الدراسات على أن تعريض الحليب إلى درجة حرارة 71.5°م ولمدة 15 ثانية يكفي لبسترته بصورة جيدة. كما أُشير إلى أن العدد الكلي للأحياء المجهرية بطريقة الأطباق للحليب المبستر بالطريقة السريعة لم يختلف كثيراً عن الحليب المبستر بالطريقة البطيئة. وإذا ما استعملت هذه الطريقة تجارياً فيجب تعريض الحليب إلى درجة حرارة 71.5°م ولمدة 15 ثانية وذلك لضمان عملية البسترة وإعطاء حد للأمان وعادة تتساوى هذه الطريقة في كفاءتها مع الطريقة البطيئة.

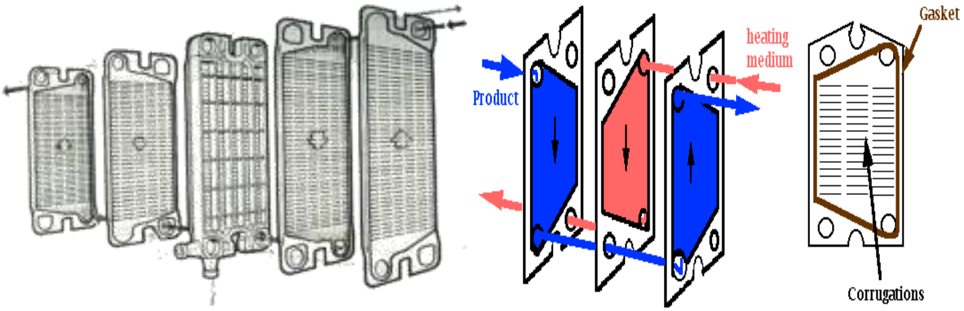
وفي عملية البسترة التي تجرى للحليب السائل بواسطة جهاز البسترة السريعة أو المبادل الحراري الصفائحي (Plate heat exchanger) يمكن رفع درجة حرارة الحليب سريعاً باستخدام المسخنات الصفائحية مع استعمل الماء كوسط للتسخين. والشكل التالي يوضح عملية البسترة التي تجرى للحليب السائل بواسطة جهاز البسترة السريعة (Plate heat exchanger).



الشكل رقم (194) يوضح عملية البسترة التي تجرى للحليب السائل بواسطة جهاز البسترة السريعة، عن (Bylund, 1995).

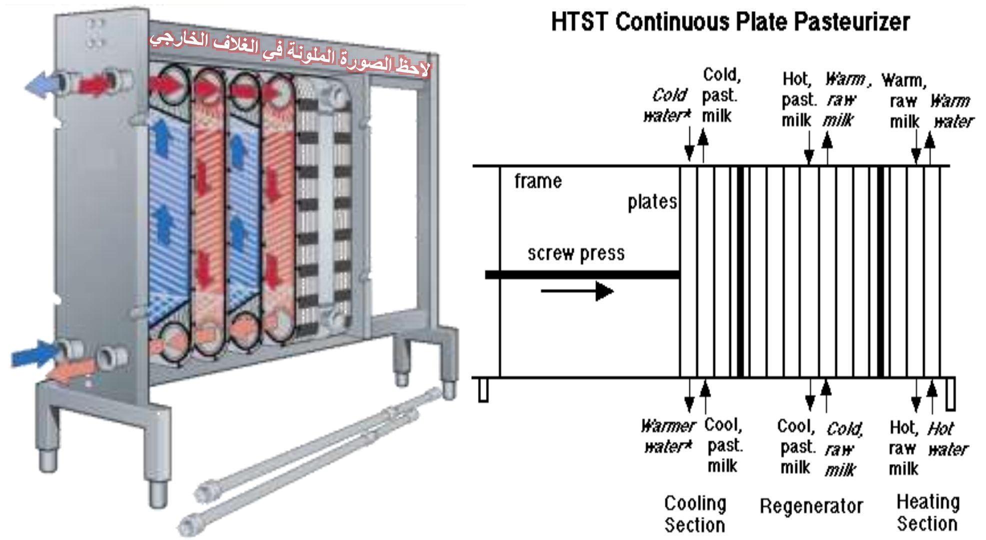
المسخنات الصفائحية Plate Heaters:

يستعمل المسخن الصفائحي على نطاق واسع في نظام البسترة السريعة. وهو يتكون من مجموعة متجاورة متلاصقة من الصفائح المصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ تضغط بعضها إلى البعض الآخر وتفصل بواسطة فواصل من المطاط Gaskets. ولهذه الصفائح عادة تعاريج وتقعر غير منتظمة لتعطي الحليب السير المتعرج عند مروره خلالها مع زيادة المساحة السطحية المعرض لها الحليب مما يؤدي إلى سرعة توصيل الحرارة. كما أن وجود الحلقات المطاطية يؤدي إلى وجود فواصل أو فتحات بين الصفائح مما توجه سير الحليب من خلالها وغالبا تكون المسافة بين الصفائح 0.25 بوصة. يدخل الحليب الخام خلال عملية التشغيل إلى جزء التسخين خلال فتحة من الأسفل أو الأعلى للجهاز اعتمادا على تصميم الجهاز ويمر الحليب في الحيز الثاني والرابع والسادس الموجود بين الصفائح من خلال فتحات العبور Cross over holes ويتوقف الحليب عند خلو فتحة العبور في صفيحة من الصفائح . أما الحيز الأول والثالث والخامس بين الصفائح فيخصص للوسط المستعمل للتسخين وبهذا يكون الحليب أو الماء بحالة متعاقبة. يمرر الحليب الخام بين العديد من الصفائح اللازمة لرفع درجة حرارته إلى درجة حرارة البسترة المطلوبة. ويعتمد عدد تيارات الحليب المتوازية المارة خلال صفائح المسخن على نوعية الجهاز.



الشكل رقم (195) يوضح شكل المسخنات الصفائحية Plate Heaters وطريقة مرور الحليب بينها، (يمين) عن (Goff, 2008)، (يسار) عن (Bylund, 1995).

يمكن إضافة بعض الصفائح في أي منطقة من مجمع الصفائح ويمكن سحب الحليب أو إرجاعه إلى النظام في أي مكان تصب فيه هذه الصفائح، وعند استعمال جزء التبادل الحراري (regenerative) فيمكن سحب الحليب الخام الدافئ القادم من هذا الجزء وتمريره خلال مرشح ثم إعادته إلى جزء التبادل الحراري ليمر خلال جزء التسخين في النهاية. كما يمكن سحب الحليب من النظام إلى جهاز أو آلة لحفظه مدة معينة من خلال الصفيحة الأخيرة في نهاية جزء التسخين من الجهاز. ويمكن تنظيم طاقة المسخن الصفائحي عن طريق إضافة أو نزع عدد من الصفائح لزيادة أو تقليل الطاقة الإنتاجية للمصنع كما يتضح دلك من الشكل التالي:



الشكل رقم (196) وضعية الصفائح وطريقة مرور الحليب وسوائل التسخين والتبريد بينها في جهاز البسترة السريعة، (يمين) عن (Goff, 2008)، (يسار) عن (Bylund, 1995).

وفي الوقت الذي يمكن فيه استعمال المسخنات لتسخين الحليب، فإنه يمكن استعمال نفس الجهاز لتبريد الحليب إذا دورنا في الجهاز ماء مثلجا أو ماء باردا بدل من الماء الحار. تمتاز هذه المسخنات بمرونة استعمالها حيث يمكن استعمال جزء التبادل الحراري في تسخين الحليب الخام القادم إلى درجة حرارة 57°م بتدوير الحليب المبستر الساخن وبعد إبقاءه على درجة حرارة البسترة لمدة المناسبة، خلال الحيز الموجود بين الصفائح المتعاقبة في الوقت نفسه يبرد هو إلى حوالي 26°م بواسطة الحليب الخام القادم . ومن ثم يمرر الحليب خلال الجزء الثالث وهو جزء التبريد ليتم تبريده نهائياً إلى 4°م، وغالبا ما تنصب الثلاث أجزاء في إطار واحد وعلى ركائز واحدة، ويمكن زيادة طاقة الجهاز بإضافة عاد من الصفائح لكل جزء دون تغير طريقة العمل أو إضافة أجهزة جديدة.

مكونات نظام البسترة السريعة Plate heat exchanger:

يتكون جهاز البسترة السريعة من عدة أجزاء هي:

1- خزان الضبط أو الموازنة Float control tank.

2- جزء تبادل الحرارة Regenerative sections.

3- جزء التسخين النهائي Final heating sections.

4- أنبوبة الحفظ Holding tube.

5- صمام السيطرة والتحويل Flow diversion valve.

6- جزء التبريد النهائي Final cooling sections.

غالباً ما يسير الحليب تحت تأثير الجاذبية من صهاريج التخزين إلى حوض الموازنة الذي يكون عادة تحت مستوى صفائح التسخين والتبريد. يضخ الحليب بعدها إلى منطقة التبادل الحراري بواسطة مضخة توقيت Timing pump حيث ترتفع درجة حرارته من 4°م إلى 57°م بواسطة الحليب المبستر الساخن الذي يمر في اتجاه معاكس بين الصفائح المجاورة، ثم يضخ تحت ضغط إلى منطقة التسخين النهائية حيث ترفع درجة حرارته إلى 72°م (أو الدرجة الحرارية التي يضبط عليها الجهاز) بواسطة الماء الساخن الذي يمر بالاتجاه المضاد بين الصفائح المجاورة. ثم يسير الحليب إلى أنبوبة الحفظ الذي يسمح طولها وقطرها بمرور الحليب لمدة بين 15 - 16 ثانية وفقاً لكفاءة الجهاز عند تصميمه. ينصب صمام السيطرة أو التحويل عند الفتحة الخارجية لأنبوبة الحفظ. ويحتوي الصمام على فتحة لدخول وخروج الحليب المبستر وصمام خارجي للحليب الذي لم تتم عملية بسترته بنجاح. ينظم سير الحليب بعد الصمام جهاز حساس سريع العمل فيسمح بمرور الحليب مثلاً إلى جزء تبادل الحرارة إذا ما وصلت درجة حرارة البسترة المطلوبة أو تزيد عنها قليلاً، حيث يُبرد بواسطة الحليب البارد القادم من صهاريج التخزين وبذا تنخفض درجة حرارته إلى حوالى 18 - 21°م، ثم يمر أخيراً إلى جزء التبريد النهائي حيث تخفض درجة حرارته بواسطة الماء المثلج أو المحلول المثلج الذي يمر بين الصفائح المجاورة وفي اتجاه معاكس لسير الحليب، وغالباً تتراوح درجة حرارة الحليب المبستر والمبرد ما بين 3.5 – 4.5°م.

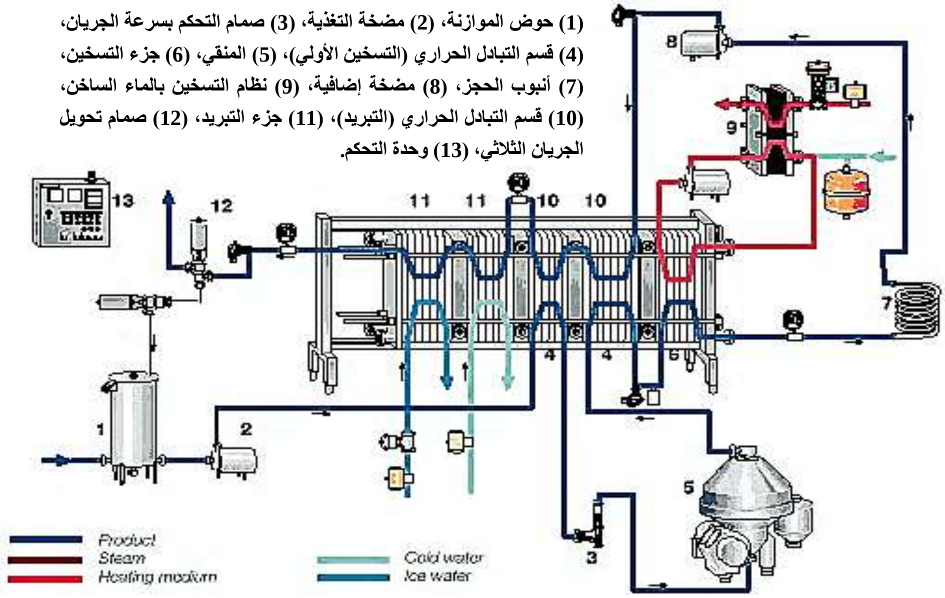
لضمان كفاءة جهاز البسترة السريعة أو المبادل الحراري الصفائحي Plate heat exchanger يجب مراعاة زيادة سطح التبادل الحراري بين الحليب وسوائل التسخين أو التبريد أو في جزء التبادل الحراري Regenerative sections بين الحليب البارد والساخن مما يؤدي إلى زيادة كفاءة اكتساب الحليب لدرجة الحرارة المطلوبة، كما يجب أن يكون سرعة سريان سوائل التسخين أو التبريد في كلٍ من جزء التسخين النهائي Final heating sections وجزء التبريد النهائي Final cooling sections ضعف معدل سرعة سريان الحليب.

وحيث أن أي معاملة حرارية هي عبارة عن درجة حرارة خلال وقت معين، فعند وصول الحليب في جزء التسخين النهائي إلى درجة الحرارة المطلوب الوصول إليها ينبغي حجزه على هذه الدرجة الحرارية (حرارة البسترة) لمدة معينه من الزمن للتأكد من القضاء على البكتيريا المرضية وتثبيط نشاط الإنزيمات ويتم ذلك في جزء الحجز في جهاز البسترة والذي هو عبارة عن أنبوبة تسمى أنبوبة الحجز أو الحفظ Holding Tube يستغرق مرور الحليب فيها مدة الحجز المطلوبة Holding Period، وينبغي أن يكون الفرق في درجات الحرارة بين درجة حرارة الحليب عند بداية دخوله أنبوبة الحجز وعند خروجه منها لا يذكر (ثبوت درجة حرارة الحليب

أثناء سريانه في أنبوبة الحجز)، كما يجب أن لا يكون هناك اختلاف في معدل سريان الحليب في المبادل الصفائحي أو في أنبوبة الحجز، مما يودي إلى كفاءة عملية البسترة، حيث أن درجة حرارة الحليب في جزء الحجز وكذلك مدة الحجز مهمة جداً، فبقاء الحليب مدة أقل من مدة الحجز يؤدي إلى عدم القضاء على الأحياء المجهرية المرضية أو تلك التي تسبب فساد الحليب المبستر وبالتالي عدم تحقيق الغاية من عملية البسترة، أما بقاء الحليب مدة أطول من مدة الحجز يؤدي إلى تغيرات تؤثر في الخواص الطبيعية والكيميائية للحليب المبستر. قد يرشح أو ينقى الحليب الساخن أثناء مروره في جهاز البسترة وهنا يغلب وضع المنقي في خط سير الحليب بعد خروجه من جزء التبادل الحراري ومضخة التوقيت. وبذا يمر الحليب من المضخة مدفوعاً خلال المرشح أو المنقي ثم جزء التسخين النهائي. هذا عند الرغبة في الحصول على الحليب المنقى. أما إذا لم يتطلب ذلك فتسهل تنقية الحليب بارداً عند استلامه وقبل دفعه إلى خزانات التخزين.

أما إذا وصل الحليب إلى صمام السيطرة والتحويل وكانت درجة حرارته دون الدرجة المطلوبة للبسترة فيمنع الصمام سير الحليب العادي ذاتياً فيتحول اتجاهه ثانية إلى حوض الموازنة وبذلك يتحتم مروره خلال جزء التسخين مرة أُخرى .

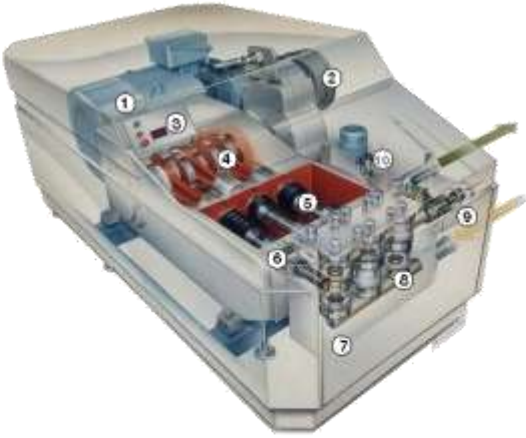
وفي ما يلي مخطط تفصيلي لعملية البسترة التي تجرى بواسطة جهاز البسترة السريعة Plate heat exchanger مع توضيح لأجزاء الجهاز ونظامي التسخين والتبريد وكذلك عملية التنقية التي تحصل للحليب بواسطة الطرد المركزي بجهاز Centrifugal clarifier.



الشكل رقم (197) مخطط تفصيلي لعملية البسترة التي تجرى بواسطة جهاز البسترة السريعة مع توضيح لأجزاء الجهاز ونظامي التسخين والتبريد، عن (Bylund, 1995).

التجنيس Homogenization:

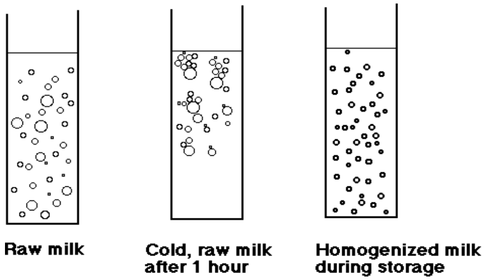
غالباً ما يتم تجنيس الحليب بواسطة جهاز التجنيس (المجنس Homogenizer). ويطلق الاصطلاح (تجنيس) على العملية التي بها يجري خلط أو استحلاب جسم صلب أو سائل في سائل آخر أو تجزئة حبيبات المستحلب الصلبة لتعطي مستحلباً Emulsion ثابتاً لا ينفصل عند تركه مدة من الزمن. وكما هو الحال في الصناعات اللبنية يكون الحليب أو القشدة هي المستحلب وحبيبات الدهن هي الأجزاء المثبتة في المستحلب وذلك بتجزئتها إلى حبيبات صغيرة عديدة حيث يقل قطر الحبيبات الدهنية من 4 – 8 ميكرون إلى أقل من 2 ميكرون فيتضاعف عددها وتزيد مساحتها السطحية الأمر الذي يودى إلى منع تلاصقها وبالتالي عدم تكوين طبقة القشدة في الحليب المجنس، وتتم عملية التجنيس بتمرير السائل في جهاز يسمى المجنس Homogenizer.



1) المحرك الرئيسي.
2) حزام ناقل.
3) مؤشر الضغط.
4) ذراع التدوير.
5) المكبس.
6) الوعاء المغلف للمكبس.
7) مضخة من الفولاذ المقاوم للصدأ.
8) صمامات.
9) وحده التجنيس.
10) وحدة نظام الضغط الهيدروليكي.

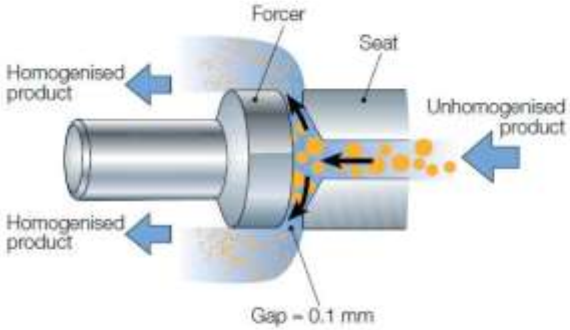
الشكل رقم (198) يوضح أجزاء جهاز التجنيس Homogenizer، عن (Bylund, 1995).

ويمكن توضيح أهمية عملية التجنيس للحليب من خلال الشكل التالي، حيث تتجمع الحبيبات الدهنية بعد ترك الحليب غير المجنس لفترة من الزمن مكونة طبقة القشدة بالقرب من سطح الحليب غير المجنس، بينما تظل الحبيبات الدهنية المجزئة للحليب المجنس منتشرة في كل أرجاء الحليب مما يمنع تكون طبقة القشدة في هذا النوع من الحليب الذي خضع لعملية التجنيس.



الشكل رقم (199) يوضح طبيعة الحبيبات الدهنية في كلٍ من الحليب الخام الطازج والحليب الخام المبرد والحليب الذي خضع لعملية تجنيس، عن (Goff, 2008).

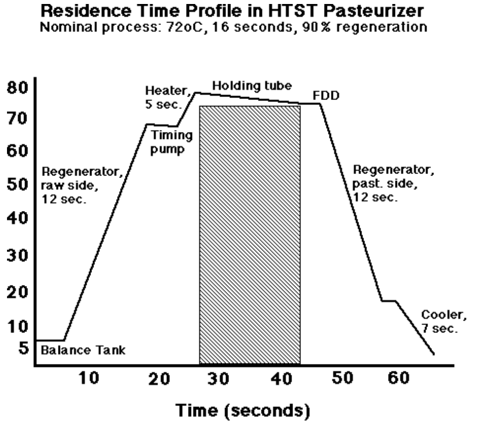
وتعتمد جميع أنوع أجهزة التجنيس على تسليط ضغط على السائل وتمريره خلال فتحة صغيرة في صمام المجنس الموضح في الشكل التالي:



الشكل رقم (200) يوضح تركيب صمام المجنس Homogenizer valve، وعملية تجزئة الحبيبات الدهنية إلى حبيبات أصغر داخل هذا الصمام، عن (Bylund, 1995).

وللمجنس مواقع عديدة لربطه مع جهاز البسترة السريعة فقد يمكن وضعه بين المضخة وجزء التسخين النهائي باستعمال صمام أمان بينهما وقد يثبت المنقي بعد المجنس وبذا يضمن إزالة الخلايا البيضاء بشكل جيد. هذا وقد يستخدم المجنس بدل المضخة لدفع الحليب خلال جهاز البسترة. كما يمكن وضح المجنس بعد جزء التسخين النهائي وقبل أنبوبة الحفظ ووضعه بعد وحدة إزالة الطعوم الغريبة وقبل دخوله إلى جزء تبادل الحرارة حيث يتم تجنيس الحليب بعد بسترته.

وعادةً ما تكون عملية التجنيس مصاحبة للمعاملة الحرارية أو قبلها مباشرة لأن تجنيس الحليب يودى إلى تمزق غلاف الحبيبات الدهنية التي كانت تحمي دهن الحليب من تأثير إنزيم اللايبيز الموجود أصلاً في الحليب وبالتالي عند عدم معاملة الحليب المجنس حرارياً (للقضاء على هذا الإنزيم) يكون عرضةً للتزنخ.



الشكل رقم (201) يوضح الوقت الذي تستغرقه كل مرحلة من المراحل التي يمر بها الحليب داخل أقسام جهاز البسترة السريعة، عن (Goff, 2008).

مقارنة بين طريقة البسترة السريعة (HTST) و البسترة البطيئة (LTLT):

إن لنظام البسترة السريعة فوائد كبيرة مقارنة بالطريقة البطيئة أهمها:

1) تحتاج حيزاً أقل عند نصبها بالمصنع حيث لا تستعمل أحواض التسخين أو المبردات المفصلة.
2) يمكن زيادة قدرة المصنع الإنتاجية دون الحاجة إلى إضافة مساحة أخرى وذلك بزيادة عدد ألواح التسخين وزيادة سعة أنبوبة الحفظ.
3) تساعد على استغلال الأيدي العاملة إلى أقص حد في المصانع الكبيرة وذلك بتوفير الوقت المخصص للتنظيف وزيادة قدرة الآلات دون الحاجة إلى زيادة عدد ساعات العمل.
4) الاقتصاد بالوقت حيث يمكن البدء في تعبئة الحليب بمجرد بسترته على عكس الطريقة البطيئة التي تستلزم انتظاراً من (40 - 60 دقيقة) وهي المدة اللازمة للبسترة في أحواض متعددة.
5) وجود الأجهزة في مكان واحد حيث يسهل تنظيفها والإشراف عليها طول وقت العمل والتنظيف. كما أنها تكون محكمة الغلق وسهلة التنظيف حيث تنظف ذاتياً بتمرير محاليل التنظيف والتعقيم خلالها.
6) وجود نظام تبادل الحرارة يؤدي إلى اقتصاد في مواد التسخين والتبريد.
7) استعمال أقل ما يمكن من الأجهزة اللازمة للبسترة إضافة إلى تقليل كمية الحليب المفقودة أثناء البسترة.
8) تؤدي دقة النظام والسيطرة على الجهاز بصورة ذاتية إلى التأكد من تنفيذ عملية البسترة على الوجه الأكمل.
9) لا توجد هناك ظاهرة عدد تكاثر البكتيريا المحبة للحرارة (Thermophilic) أثناء البسترة حيث لا تساعد درجة الحرارة العالية على نموها.

أما عيوب البسترة السريعة فهي:

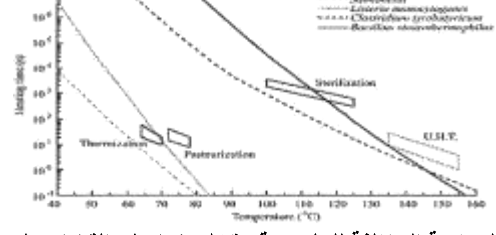
1) سرعة استهلاك بعض الأجزاء غير المعدنية.
2) لا يمكن إخراج الكمية المتبقية من الحليب بالجهاز إلا إذا دفعت بالماء وفي هذه الحالة لا يمكن مزج هذا الحليب مع الحليب الأخر لكن يمكن فرزه والحصول على القشدة منه.
3) يحصل فقد لجزء من المحلول الملحي المستخدم في التبريد عند فصل الألواح لتنظيفها.

<u>التعقيم Sterilization:</u>

هنـاك العديـد مـن المعـاملات الحراريـة الأُخـرى (غيـر البسـترة) التـي يعامـل بهـا الحليـب ومنتجات الألبان، وهي تختلف فيما بينها تبعاً للخواص المطلوبة في المنتج بعد التصنيع، ومن أمثلة هذه المعاملات الحرارية ما يعرف بـ **Thermization** التي يتم اللجوء إليها من قبل العديد من منتجي الحليب ومنتجات الألبان فقط بهدف زيادة قابلية حفظ الحليب ومنتجاته على درجة حرارة الثلاجة، وذلك بتسخين الحليب على درجة حرارة تتراوح بين 63 - 65°م بدون حجز أو في الغالب لمدة تتراوح بين 15 – 20 ثانية.

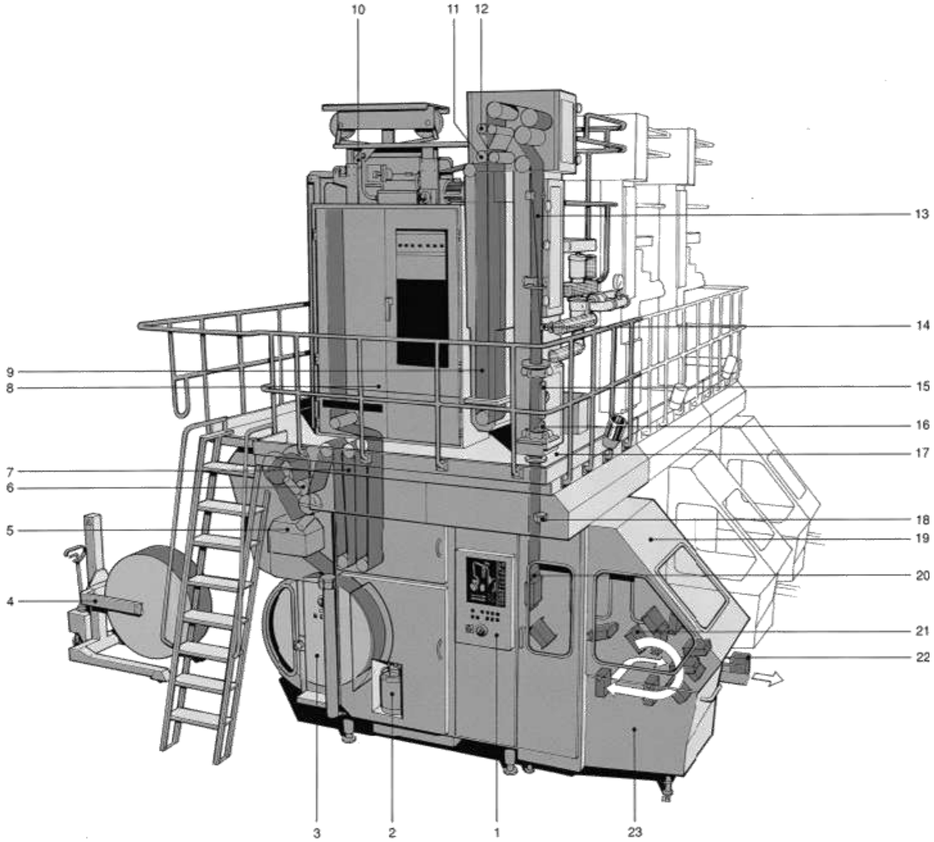
كذلك من المعاملات الحرارية المتبعة في معامل الحليب ومنتجات الألبان عملية التعقيم، ويعقم والحليب (تعقيم تجاري) بتعريضه إلى درجات حرارة تزيد عن 100°م، ويعبئ في عبوات خالية من الهواء، وهو قد يعبئ إما قبل أو بعد التعقيم، ولسنوات عديدة كانت طريقة التعقيم التجارية الوحيدة تتمثل في تعبئة المنتج في عبوات زجاجية مغلقة يتم تعقيمها بعد التعبئة في معقمات معينة باستخدام البخار على درجة حرارة تتراوح بين 105 – 120°م وتحت تسليط ضغط معين ولمدة تتراوح بين 10 – 15 دقيقة، لكن هذه الطريقة بدأت في التراجع بشكل كبير جداً في الوقت الحاضر، حيث أنه ونتيجة لبقاء الحليب فترة طويلة بدرجة الحرارة هذه يكتسب الحليب طعم خاص ولون يميل إلى البني، والشكل رقم (137) يوضح أحد أنواع المعقمات المستخدمة في تعقيم الحليب المعروفة بمعقمات الأبراج **Tower sterilizer**.

ومن أهم الطرق الأخرى شائعة الاستعمال لمعاملة الحليب بالحرارة لغرض التعقيم طريقة المعاملة بالحرارة الفائقة **(UHT) Ultra high temperature** وهي طريقة محورة لطريقة البسترة السريعة وتستعمل بصورة أساسية للحليب كما تستعمل في الوقت الحاضر بصورة ناجحة لمعاملة خليط المثلجات القشدية والقشدة، وتعرف هذه الطريقة بأنها الطريقة التي يسخن فيها المنتج إلى درجة لا تقل عن 132°م ولمدة لا تقل عن الثانية. وفي بعض الطرق يسلط على المنتج ضغط يصل إلى حوالي 100 رطل على البوصة المربعة وذلك للحصول على التدفق السريع ولمنع احتراق المنتج على الألواح عند مروره خلال المبادل الحراري، وقد يسخن المنتج مرة أخرى بعد هذه المعاملات الحرارية القاسية وذلك بحفظه على درجة حرارة 82°م ولمدة 25 ثانية.



الشكل رقم (202) المعاملات الحرارية المختلفة للحليب وقدرة كلٍ منها على القضاء على أنواع من الأحياء المجهرية.

إن المنتجات التي تعامل بالحرارة الفائقة Ultra high temperature (UHT) تكون معقمة في نهاية مرحلة التسخين، فإذا ما أريد الحصول على إنتاج منتجات معقمة فيجب معاملة أو إمرار المنتج خلال جهاز تجنيس معقم ثم تعبئته أو تعليبه بطريقة معقمة. والأساس في عملية التعقيم بواسطة المعاملة بالحرارة الفائقة UHT، تهدف إلى تعقيم الغذاء قبل عملية التعبئة أو التغليف، ثمّ تعبئته في العبوات المعقّمة في جوّ معقّم Sterile Atmosphere، والشكل التالي يوضح أحد ألآت التعبئة المستخدمة لتعبئة الحليب المعامل بالحرارة الفائقة UHT من صنع شركة Tetra Pak الشهيرة بهذا النوع من النشاط.



(1) وحدة التحكم، (2) حاوية لـ H_2O_2 مغلقة النظام، (3) بَكَرة مادة التغليف، (4) عربة نقل بَكَرة مادة التغليف، (5) وحدة آلية للتحكم في سير لمادة التغليف، (6) وحدة وضع ختم تاريخ الإنتاج وانتهاء الصلاحية، (7) بكرات سير مادة التغليف، (8) وحدة النظام الكهربائي للماكينة، (9) وحدة تعقيم مادة التغليف في حمام عميق من مادة H_2O_2، (10) وحدة معالجة منطقة اللحام الجانبي في العبوة، (11) أسطوانات إزالة H_2O_2 من مادة التغليف، (12) خراطيم الهواء الحار للتأكد من إزالة H_2O_2 من مادة التغليف، (13) وحدة تشكيل مادة التغليف إلى الشكل الأنبوبي، (14) أنبوب التعبئة، (15 و 16) وحده اللحام الجانبي للعبوة، (17) منصة الماكينة، (18) خلية ضوئية لمراقبة عملية التعبئة و التغليف، (19) الغطاء الأمامي للماكينة، (20) العبوات أثناء التشكيل والغلق (21) العبوات المشكلة والتي اكتمل عملية لحامها الرأسي والجانبي، (22) العبوة النهائية في طريقها لوحدة التغليف النهائي في الكراتين، (23) الوحدة المستخدمة في التنظيف الخارجي للماكينة.

الشكل رقم (203) يوضح إحدى ألآت Tetra Pak المستخدمة لتعبئة الحليب المعامل بالحرارة الفائقة (UHT)، عن (Tamime and Robinson, 1999).

تقسم طرق المعاملة بالحرارة الفائقة Ultra high temperature (UHT) إلى نوعين من الطرق تبعاً لطريقة توصيل الحرارة هما الطريقة المباشرة و الطريقة غير المباشرة وهما يختلفان عن بعضهما في نظام التسخين، وفي كلا الطريقتين عامل التسخين النهائي هو البخار والذي يصبح في تماس مباشر مع الحليب فقط في الطريقة المباشرة.

أولاً الطريقة المباشرة:

وفيها يتم تسخين المنتج باستخدام البخار وذلك بأحد الأسلوبين التاليين:

الأسلوب الأول- حقن البخار في المنتج Injection، كما يتضح من الشكل رقم (204)، ومن أهم أمثلتها ما يلي:

1- طريقة Alfa-Vacu-Therm Instant Sterilizer (VTIS):

في هذه الطريقة يسخن الحليب تسخينا أولياً وعلى مرحلتين في أولاهما ترفع درجة الحرارة إلى 60°م وفي الثانية إلى 76.7° ووسيلة التسخين في كلا المرحلتين هو البخار المسيطر عليه أوتوماتيكيا، بعدها يضخ الحليب إلى حيث يضخ إليه بخار تحت ضغط يرفع درجة حرارته حالاً إلى 140.5°م ويبقى على تلك الدرجة مدة أربع ثواني على هذه الدرجة. يجنس الحليب ويبرد إلى حوالي 20°م.

2- طريقة التصعيد The Up Sterilization Process (uperisation):

يسخن الحليب بهذه الطريقة بواسطة بخار مضغوط إلى درجة حرارة 148.8°م ويحجز لمدة 2.4 ثانية. تتميز هذه الطريقة بان طعم الحليب الناتج يشبه طعم الحليب الخام وانه مقاوم بدرجة كبيرة للأكسدة وقابليته للهضم عالية و أن تأثر فيتامين C قليل في هذه المعاملة الحرارية وان القيمة الغذائية للحليب مكافئة للحليب المبستر.

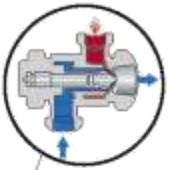
3- طريقة Cherry-Burrel الأمريكية:

وفيها ترفع درجة حرارة الحليب إلى 145°م لمدة 4 ثواني.

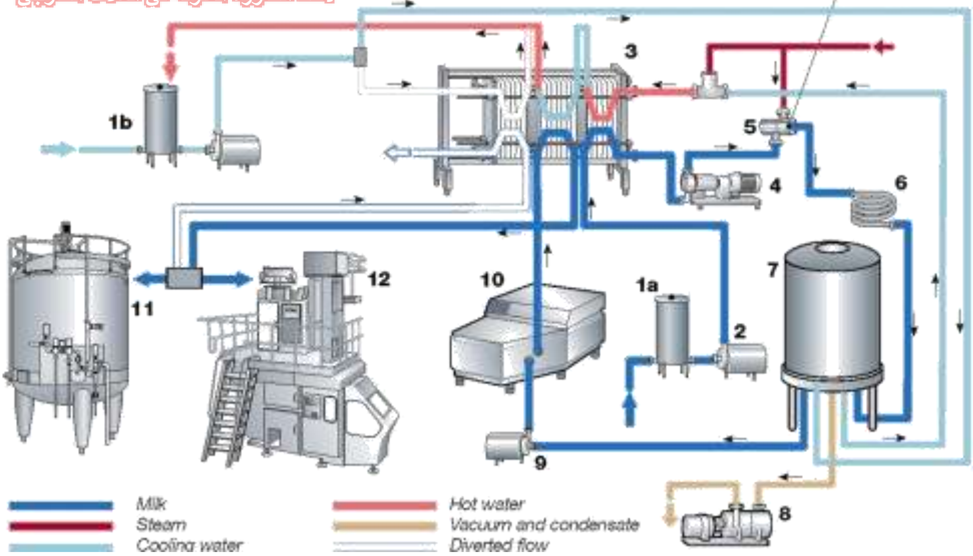
الأسلوب الثاني- رش المنتج في جو من البخار Infusion، ويتضح من الشكل رقم (205).

ومن أهم أمثلتها الطريقتين Laquitharre و Thermovac الفرنسيتين وتستعملان درجة حرارة 145°م وفيها يرش الحليب داخل وعاء به بخار مضغوط، وهناك طريقة ثالثة تتبع نفس هذا الأسلوب وتسمى Palarisator وهي لشركة Silkeborg الدانمركية و فيها يسخن الحليب إلى 145°م وقد أُستعملت هذه الطريقة مع أجهزة Tetra Pak عكس الطريقتين الفرنسيتين السابق ذكرهما.

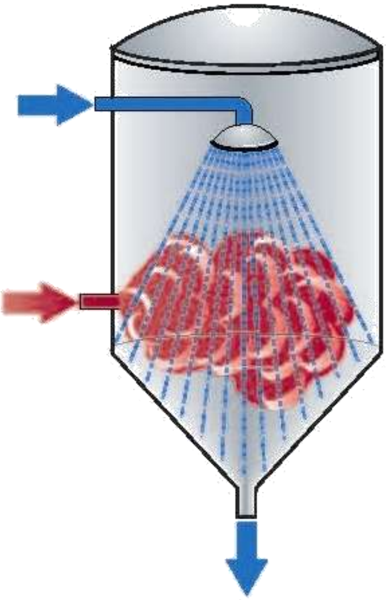
(1a) حوض الموازنة للحليب، (1b) حوض الموازنة للماء، (2) مضخة تغذية، (3) المبادل الحراري الصفائحي، (4) مضخة، (5) راس الحقن بالبخار، (6) أنبوبة الحجز، (7) حجرة تكثيف، (8) مضخة تفريغ، (9) مضخة نابذة، (10) مجنس معقم، (11) خزان معقم، (12) تعبئة معقمة بأحد مكائن Tetra Pak.



لاحظ الصورة الملونة في الغلاف الخارجي



الشكل رقم (204) المعاملة بالحرارة الفائقة UHT بأسلوب حقن البخار في المنتج، عن (Bylund, 1995).



الشكل رقم (205) يوضح عملية رش الحليب في جو من البخار Infusion، عن (Bylund, 1995).

ثانياً طريقة التسخين غير المباشر، (لاحظ الشكل رقم 194) - ومن أنواعها:

1- طريقة APV Ultrmatic plant:

وهذه الطريقة باسم الشركة الانجليزية APV وتستعمل فيها درجة حرارة 137.8°م، شرط أن يبقى الحليب عليها لمدة ثانيتين.

2- طريقة Graves-Stambaugh process:

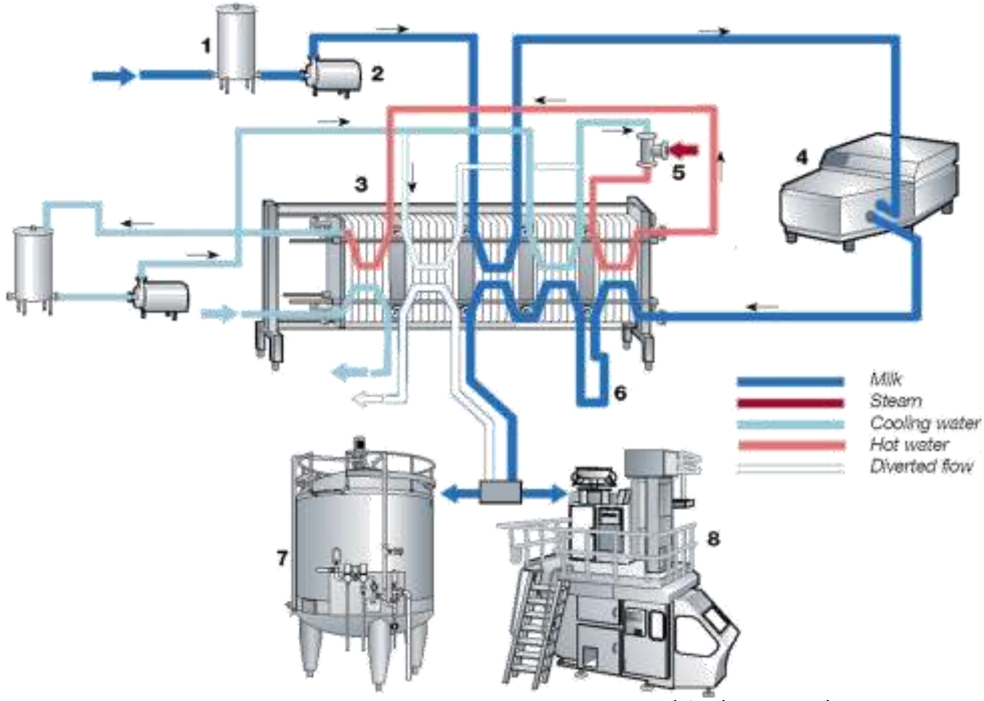
وفيها يمر الحليب بسرعة 6 – 7.5 متر بالثانية في حركة دوامية وترفع درجة حرارته بصورة غير مباشرة إلى ما بين 140.5 – 143.3°م ويستغرق مروره في قسم الحجز holding مدة 9 ثواني.

3- طريقة Stork sterideal:

صممت هذه الطريقة شركة Stork في هولندا، وفيها يتم تسخين الحليب لدرجة حرارة بين 139 – 148.8°م.

4- طريقة Alfa-Vacu-Therm Instant Sterilizer (VTIS):

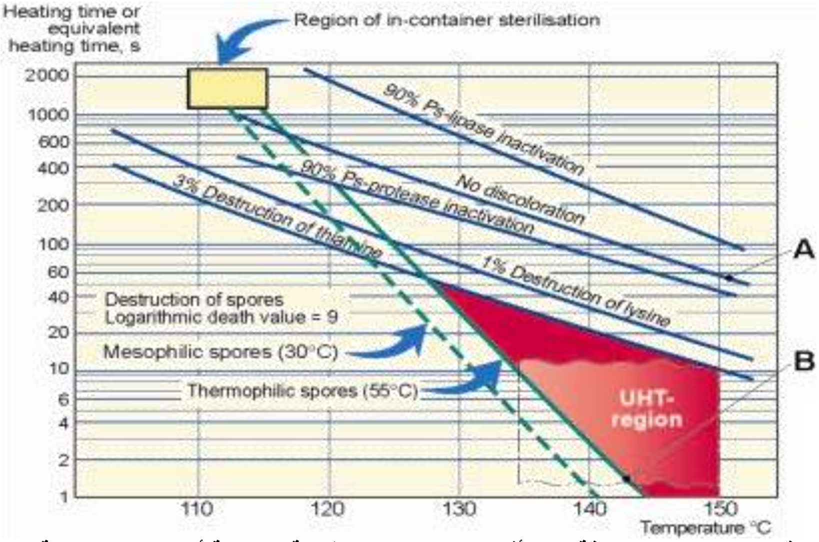
يسخن الحليب لدرجة حرارة 137.7°م، ويحجز على هذه الدرجة الحرارية لمدة 4 ثواني.



(1) حوض الموازنة، (2) مضخة تغذية، (3) المبادل الحراري الصفائحي، (4) مجنس غير معقم، (5) راس الحقن بالبخار، (6) أنبوبة الحجز، (7) خزان معقم، (8) تعبئة معقمة بأحد مكائن Tetra Pak.

الشكل رقم (206) المعاملة بالحرارة الفائقة UHT بطريقة التسخين غير المباشر، عن (Bylund, 1995).

ويتضح من خلال الشكل التالي العلاقة بين تأثير تعقيم الحليب سواء بالطريقة التقليدية في العبوات **in-container sterilisation** (على درجة حرارة تتراوح بين 105 – 120°م ولمدة تتراوح بين 10 – 15 دقيقة) والمعاملة بالحرارة الفائقة **Ultra high temperature**، والتغيرات الكيميائية التي تحدث في الحليب المعقم بكلا الطريقتين.



الشكل رقم (207) يوضح العلاقة بين تأثير تعقيم الحليب بالطريقة التقليدية أو بالحرارة الفائقة (UHT) والتغيرات الكيميائية التي تحدث فيه، عن (Bylund, 1995).

ويمكننا من خلال الشكل السابق ملاحظة منطقة التعقيم في العبوات **in-container** ومنطقة المعاملة بالحرارة الفائقة (UHT)، وكذلك التغيرات الكيميائية وتفاعل الاسمرار وتحطم بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية بتأثير المعاملات الحرارية، مع ملاحظة أن الخط **A** يشير إلى الحد الأدنى من تأثير المعاملة الحرارية التي تسبب اسمرار الحليب، في حين أن الخط **B** يشير إلى الحد الأدنى لإتمام عملية التعقيم للحليب (إبادة الأبواغ المحبة الحرارة العالية **Thermophilic spores**)، حيث يوضح الشكل بأن كلا الطريقتين لهما نفس تأثير التعقيم، لكن هنالك اختلاف كبير في التغيرات الكيميائية وتفاعل الاسمرار وتحطم بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية لكلا الطريقتين، ففي المعاملة بالحرارة الفائقة **UHT** تكون تلك التغيرات والتأثيرات أقل بكثير ولذلك فإن طعم الحليب المعامل بهذه الطريقة يكون أحسن، وقيمته الغذائية أعلى مما هي في طريقة التعقيم التقليدية في العبوات **in-container**، حيث يمتلك الحليب المعامل بالحرارة الفائقة مظهر الحليب العادي ولكنه عادة لا يخلو من الطعم المطبوخ والذي يسمى الطعم الطباشيري ويمكن الحد من هذا الطعم المطبوخ بإضافة مواد مؤكسدة ملائمة أو مواد لها قابلية الاتحاد مع المركبات الكبريتية المتكونة نتيجة هذه المعاملة، و أيضاً بالسيطرة بصورة جيدة على درجة الحرارة والوقت المستعملين.

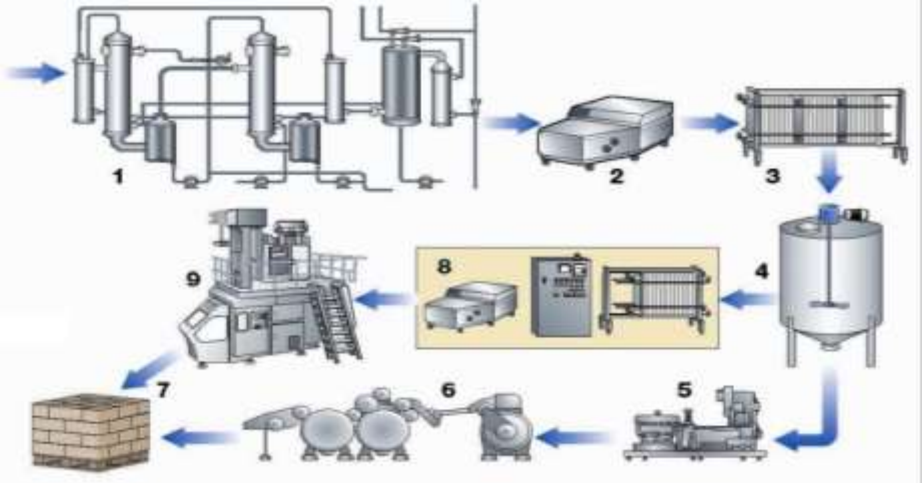
الفصل الرابع عشر

ميكروبيولوجيا منتجات الحليب Milk Products Microbiology

ميكروبيولوجيا الحليب المبخر والمركز Evaporated and Concentrated Milk:

الحليب المبخر Evaporated هو المنتج المعقم (تجارياً) المحضر من تركيز الحليب الخام الكامل أو المنزوع الدسم بإزالة جزء من رطوبته مع عدم إضافة السكر، ويمكن تحضيره من الحليب المعاد تركيبه وعندها يسمى الحليب المركز Concentrated بدلاً من الحليب المبخر لأنه لا يتعرض لعملية التبخير لنزع جزء من رطوبته وإنما يحضر بشكله المركز منذ البداية.

وعند تحضير الحليب المبخر يسخن الحليب الخام تسخيناً مبدئيا إلى 95°م لمدة 10 - 15 دقيقة. يجنس بعد ذلك ثم يكثف إلى نحو 40 % من حجمه بالتسخين إلى 32.2 - 45°م تحت التفريغ ثم يبرد سريعا إلى 5°م، بعدها يعبأ الحليب المبخر في علب معدنية ثم تعقم في مجال من درجات الحرارة يتراوح بين 115.5 - 120°م لمدة 15 - 20 دقيقة، أو في عبوات كرتونية Tetra Pak وتعقم بواسطة بالحرارة الفائقة UHT. أما عند تحضير الحليب المركز من الحليب المعاد تركيبه فيتم عندها رفع المواد الصلبة الكلية إلى الضعف عما هو عليه الحال عند تحضير الحليب السائل المعاد تركيبه، وقد يتم استبدال دهن الحليب بالدهن النباتي في مثل هذا النوع من المنتجات عندها يسمى المنتج بالحليب المركز مستبدل الدهن Concentrated filled milk، وبالمثل فقد يتم تعبئة الحليب المركز في علب معدنية يتم غلقها ثم تعقمها أو في عبوات كرتونية Tetra Pak وتعقم بواسطة بالحرارة الفائقة.



1) التبخير، 2) التجنيس، 3) التبريد، 4) خزّان وَسيط، 5) التعليب في علب معدنية، 6) التعقيم، 7) التخزين، أو كعملية بديلة لـ (5) و (6): 8) المعاملة بالحرارة الفائقة، 9) التعبئة المعقمة.

الشكل رقم (208) يوضح خطوات إنتاج الحليب المبخر Evaporated Milk، عن (Bylund, 1995).

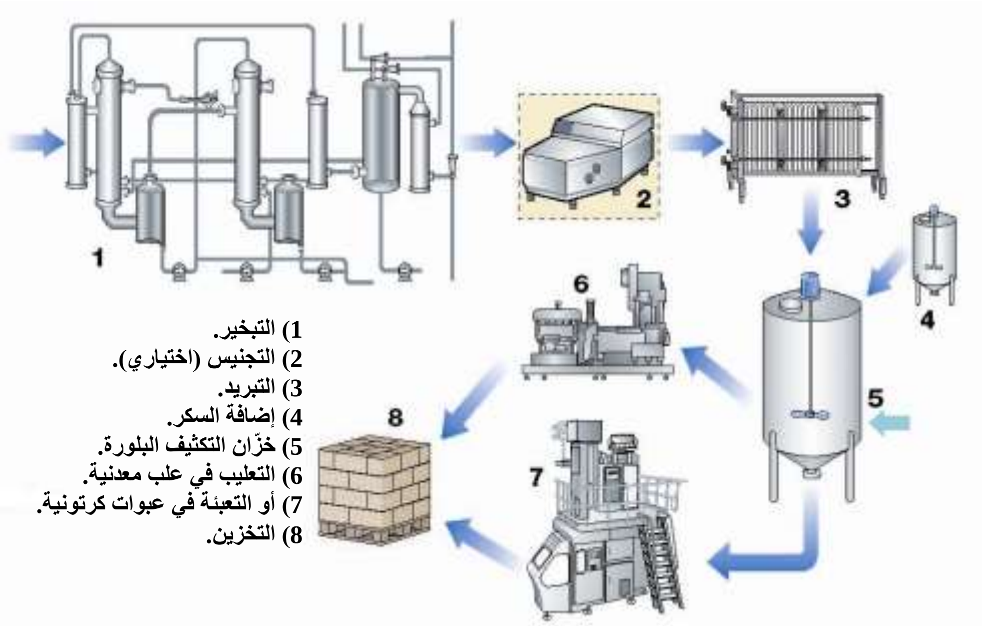
يؤدى تعقيم العلب إلى القضاء على خلايا جميع أنواع البكتيريا الخضرية و كذلك جميع الأعفان والخمائر كما يقضى أيضا على جراثيم الأعفان وعلى الغالبية العظمى من الأبواغ البكتيرية. ومن جهة أخرى نجد أن أنواع البكتيريا المكونة للأبواغ التي مصدرها الحليب الخام تتميز بشدة مقاومتها للحرارة مما يمكنها أن تنبت وتسبب فساد العلب قبل أن تفتح، فينشأ عن نمو بكتيريا *Clostridium* تولد الغازات، كما أن أنواع جنس *Bacillus* مثل *B. coagulans* قد تسبب تحلل بروتين الحليب وتؤدى إلى ظهور الطعم المر، وتقوم *B. subtilis* subsp. *subtilis* بهضم الكازين و خفض لزوجة الحليب المركز. وقد يحدث تلوث للحليب أثناء عملية تبخيره تحت التفريغ ببكتيريا *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*، وهنا سوف تبقى هذه البكتيريا فيه وسوف يلائم نموها درجات الحرارة السائدة أثناء التبخير ولن تتأثر سواء بارتفاع تركيز المواد الصلبة الكلية في الحليب أو بانخفاض الضغط. وبالرغم من أن حرارة التعقيم سوف تقضى على هذه البكتيريا إلا أنها تفرز سموم معوية وبالتالي تسبب التسمم الغذائي عند تناول الحليب المبخر الناتج.

ولا تقتصر مصادر تلوث الحليب المبخر على ما ورد ذكره بل قد ينشا أيضا نتيجة عدم إحكام غلق العلب مما يجعل الميكروبات تتسرب إلى داخلها وهي من الأنواع التي يمكنها أن تنمو في وجود الضغط الاسموزي المرتفع وسوف نذكرها بشيء من التفصيل عند تناولنا لميكروبيولوجيا الحليب المكثف المحلى.

ميكروبيولوجيا الحليب المكثف المحلى Sweetened Condensed Milk:

الحليب المكثف المحلى هو الناتج من تركيز الحليب الخام الكامل الدسم أو المنزوع الدسم بإزالة جزء من رطوبته مع إضافة السكر، ويجوز إضافة بعض المثبتات إليه ويمكن تحضيره من الحليب المعاد تركيبه. وتتراوح نسبة المواد الصلبة الكلية فيه بين 28 – 31 % والدهن بين 8 – 9 %، كما يحتوي على 43 – 45 % سكر.

ويحضر الحليب المكثف المحلى بتسخين الحليب مبدئيا إلى 77 – 78.5°م لمدة 10 - 15 دقيقة وقد تستخدم درجات حرارة أعلى لفترات زمنية أقصر، يضاف بعد ذلك السكر على صورة محلول مركز (70 – 80 %) سبق معاملته حرارياً على حرارة تتراوح بين 80 – 88°م لعدة دقائق، ويغلى الخليط تحت ضغط منخفض على درجة حرارة 54 – 63°م لتكثيفه، وعند وصول الحليب المحلى إلى درجة التكثيف المطلوبة يتم تبريده ويكون التبريد سريعا في البداية ثم يقل معدل التبريد بعد ذلك لتجنب تبلور السكر، ثم يعبى في عبوات معدنية أو في عبوات كرتونية، كما هو موضح في الشكل التالي:



الشكل رقم (209) يوضح خطوات صناعة الحليب المكثف المحلى **Sweetened Condensed Milk**، عن **(Bylund, 1995)**.

إن التسخين المبدئي للحليب الخام يعمل على خفض نسبة كبيرة من محتوياته الميكروبية. ويفضل استعمال شراب السكر السائل والذي سبق معاملته حرارياً عن السكر المتبلور (السكر الجاف) لأن الأخير يكون في العادة ملوثا وبالتالي فان إضافته إلى الحليب قد ينتج عنها زيادة واضحة في أعداد البكتيريا والخمائر، ومن المعتاد أن يرتفع العد البكتيري بعد إضافة السكر إلى 10,000 وحدة مكونة للمستعمرة/مل إلا أن هذا الرقم سوف ينخفض كثيرا أثناء التركيز في قدر التكثيف بحيث يتوقع أن يحتوى الناتج النهائي على نحو 400 وحدة مكونة للمستعمرة/مليلتر، وبالرغم من وجود خلايا حية إلا أن معظم العلب يمكنها أن تبقى صالحة بدون أن تفسد لفترات طويلة حيث يتعذر نمو الخلايا في الحليب المكثف نتيجة لارتفاع الضغط الاسموزي للسكر وكذلك بسبب التفريغ الحادث للعلب أثناء التعبئة مما يحرم الخلايا الميكروبية الهوائية من الأوكسجين الجزيئي، ونتيجة لكل لذلك يلاحظ تناقص أعداد الخلايا الميكروبية بوجه عام أثناء تخزين الحليب المكثف المحلى. والأحياء المجهرية التي يحتمل وجودها بالحليب المكثف المحلى هي:

1- جنس *Bacillus* وخصوصـــــــاً *B. subtilis* subsp. *subtilis* و *B. coagulans* و *B. megaterium* و *B. cereus* وكذلك *B. stearothermophilus*، إضافةً إلى أنواع أُخرى تابعة للجنس *Clostridium* وخصوصاً *C. thermosaccharolyticum* نظراً لأنهما من الأنواع المتجرثمة التي تتحمل المعاملات الحرارية التي يمر بها المنتج والتي تتحمل الضغط الاسموزي العالي.

2- أنواع بكتيريا القولون **Coliform bacteria** وهذه قد توجد في بعض العلب لكنها لا تسبب التلف لعدم ملائمة الوسط لنموها. غير أنه إذا فرض وبدأ السكر في التبلور نتيجة لعدم ضبط سرعة تبريد الحليب بعد التكثيف فان بكتيريا ***Enterobacter aerogenes*** قد تنمو منتجة كمية كبيرة من الغاز الذي يسبب انتفاخ العلب. والظروف الأخيرة أيضا تلائم إنتاج الغازات بواسطة بكتيريا ***Clostridium butyricum***، ونظراً لان بكتريا القولون في الحليب الخام يقضى عليها بالتسخين المبدئي لذا فان وجودها في الحليب المكثف يؤخذ دلالة على حدوث التلوث أثناء التبريد أو التعبئة أو بعدها.

3- بعض أنواع الجنس ***Micrococcus*** والتي قد تكون قاومت حرارة التسخين أو تسربت إلى الحليب المكثف أثناء التبريد والتعبئة وهذه الأنواع تستطيع أن تنمو في تراكيز عالية نسبيا من السكر وتقوم بتحليله منتجة كميات وافرة من الحامض ومسببة ثخانة قوام الحليب المكثف.

4- الخمائر التي يكون مصدرها في العادة السكر المضاف وتشمل صنفين رئيسيين هما ***Torula lactis-condensi*** وأيضاً ***T. globosa***. وهذه الخمائر قد تسبب الانتفاخ الغازي للعلب إذا حفظت في جوا دافئ لمدة تزيد عن أسبوع. ومن الصعوبة نمو هذه الخمائر إذا ما تمت عملية التفريغ للهواء أثاء التعبئة بشكل جيد حيث أنها تحتاج إلى ظروف هوائية كي تبدأ نموها في البداية (ويستمر النمو بمد ذلك في ظروف لاهوائية).

5- الأعفان وخصوصاً ***Aspergillus repens*** و ***A. glaucus*** و ***Sporendonema sebi*** وهي تنمو بشكل مستعمرات ينتج عنها تخمر الحليب في مناطق نمو المستعمرات مكونة كتل مختلطة من الحليب المتخثر والنمو الفطري وتعرف هذه المناطق بالأزرار **Buttons** وهي توجد طافية على السطح، وهذا النمو يكسب الحليب المكثف المحلى طعماً مر ورائحة زنخة. ونظراً لأن الأعفان هوائية (تحتاج إلى ظروف هوائية كي تنمو)، فيمكن تجنب حدوث عيب تكون الأزرار **Buttons** الناتج عن نمو الأعفان المشار إليها بتعبئة الحليب المكثف في علب مفرغة من الهواء بشكل جيد حيث يعمل ذلك على إيقاف نمو تلك الأعفان.

ميكروبيولوجيا الحليب المجفف Dried Milk:

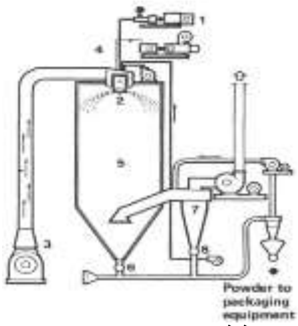
الحليب المجفف هو الناتج من تجفيف الحليب الخام الكامل الدسم أو المنزوع الدسم جزئياً أو كلياً ولا يشمل الحليب المجفف المخصص لتغذية الرضع. ولإنتاج الحليب المجفف يتم تبخير الرطوبة (الماء) الموجودة في الحليب بكاملها تقريباً حيث يتحول إلى مسحوق تبلغ نسبة الرطوبة فيه مدى يتراوح بين 3 – 5 %، وهناك طريقتان رئيسيتان لتجفيف الحليب هما التجفيف بالأسطوانات Roller drying والتجفيف بالرذاذ Spray drying.

1- طريقة التجفيف بالأسطوانات Roller drying:

في هذه الطريقة يتم نشر الحليب على هيئة طبقة رقيقة على سطح الاسطوانات المسخنة بالبخار من الداخل لدرجات حرارة تصل إلى 138°م وتكون هذه الاسطوانات في حالة دوران مستمر فتتبخر رطوبة الحليب ثم يكشط غشاء الحليب المجفف المتكون بواسطة سكاكين خاصة. وتجرى عملية التجفيف بهذه الطريقة إما في وجود الهواء أي تحت الضغط الجوي العادي أو تدور الاسطوانات داخل غرفة مفرغة من الهواء في درجة حرارة 40°م. قد يجفف الحليب كما هو أو بعد تركيزه بالتبخير. ولقد عُرِفت طريقة التجفيف بالأسطوانات على أنها أكفاء طرق التصنيع من الناحية الميكروبيولوجية، وتكمن كفاءتها الميكروبيولوجية في الحرارة العالية التي يتعرض لها المنتج عند ملامسة الأسطوانات الساخنة خلال مرحلة التجفيف، وبالرغم من أن شهرتها قد تلاشت بالنسبة لصناعة الألبان وتحولت لصالح التجفيف بالرذاذ الذي يعد الأكثر انتشاراً.

2- طريقة التجفيف بالرذاذ Spray drying:

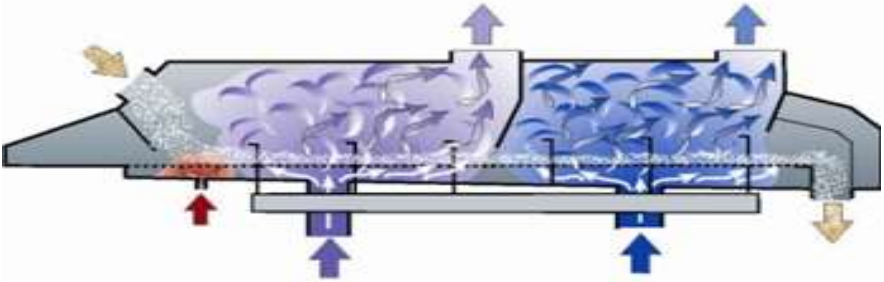
هذه الطريقة تتضمن تسخين الحليب مبدئيا إلى 88°م لمدة 20 ثانية ثم تتم عملية تركيزه بالتبخير، بعدها يضخ الحليب المركز على صورة رذاذ رقيق داخل غرفة خاصة يمر فيها تيار من الهواء الساخن فيتبخر الماء من الحليب في الحال يتحول بعد ذلك الحليب إلى مسحوق. والشكل التالي يوضح طريقة التجفيف بالرذاذ.



1- مضخة حليب عالية الضغط،
2- وحدة الرش بالرذاذ،
3- وحدة التزويد بالهواء الساخن،
4- حجرة الخلط،
5- حجرة التجفيف،
6- وحدة التفريغ،
7- وحدة تنظيف الهواء.

الشكل رقم (210) يوضح طريقة التجفيف بالرذاذ لإنتاج الحليب المجفف، عن (Bylund, 1995).

ومن منتجات الحليب المجفف بطريقة الرذاذ، الحليب المجفف سريع الذوبان Instant Dried milk، وقد أدى ظهور صناعه المنتجات سريعة الذوبان إلى إدخال إضافات أكثر لجهاز التجفيف بالرذاذ، مما أدى إلى زيادة المخاطر الميكروبيولوجية، وفي هذا النوع من المنتجات تجرى عمليه تكوين تجمعات للمسحوق تحسن من خصائص بلل وانتشار الحليب المجفف.



الشكل رقم (211) إنتاج الحليب المجفف سريع الذوبان Instant Dried milk، عن (Bylund, 1995).

الاعتبار المبدئي في فحص الحليب الخام المعد لصناعة الحليب المجفف هو تقدير أعداد الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة العالية، ويعد هذا الإجراء مهماً بالنسبة لجودة المنتج النهائي، كما أن اختبار العدد الكلي للمستعمرات وتقدير بكتيريا القولون ذا أهمية كبرى في تقويم الجودة الصحية للمصنع بصورة عامة ولكن لهما تأثير أقل على جودة المنتج النهائي من اختبار تقدير أعداد الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة العالية. إن الطرق الروتينية لضبط جودة مسحوق الحليب المجفف بالأسطوانات يجب أن تهتم بتحديد مناطق الخطر كما يجب أخذ العينات على أساس دوري منتظم، آما عملية أخذ العينات للتحليل الميكروبيولوجي فتتم كالتالي:

1- من الحليب الخام.

2- من الحليب بعد التعديل والبسترة.

3- من الحليب المركز في خزان الموازنة قبل التجفيف.

4- من الحليب المجفف في أسطوانات التجفيف.

5- من الحليب المجفف في صهريج قبل التعبئة.

6- من الحليب المجفف في العبوة النهائية.

ولا يصح أن ينظر إلى الحليب المجفف على انه معقم ميكروبيولوجياً بل انه يحتوى بالضرورة على أعداد من الكائنات الحية وهذا يتوقف على العدد الأصلي في الحليب الخام وعلى مدى مقاومة تلك الأحياء للمعاملات الحرارية، وعلى مدى العناية التي تبذل أثناء التصنيع لمنع حدوث أي تلوث من مصادر خارجية، وبصفة عامة توجد البكتيريا في الحليب المجفف الذي روعي في إنتاجه النظافة وكان مصدره حليباً خاماً جيداً بأعداد قليلة تتناقص أثناء التخزين، إلا انه لو فرض وحدث ترطيب للحليب المجفف أثناء الحفظ فان ذلك سوف يؤدى إلى سرعة زيادة أعداد

الخمائر والأعفان فقط أما البكتيريا فانه لا تحدث فيها أي زيادة ملحوظة قبل أن يتم استرجاع الحليب المجفف بالماء. ويتميز الحليب المجفف بطريقة الاسطوانات باحتوائه على أعداد محدودة من الكائنات الحية نتيجة لارتفاع حرارة التجفيف حيث يقتصر ذلك على البكتيريا المكونة للأبواغ خصوصاً جنس ***Bacillus*** مثل ***Bacillus cereus*** و ***B. coagulans*** و ***B. megaterium*** و ***B. stearothermophilus***، وبناء على ذلك فإن الحليب المسترجع المحضر من الحليب المجفف بطريقة الاسطوانات قد يتعرض للتجبن الحلو إذا ما ترك لفترة طويلة بعد تحضيره.

وعكس ما ذكرناه عن الحليب المجفف بطريقة الاسطوانات، نجد أن الحليب المجفف بطريقة الرذاذ يحتوى على أعداد من البكتيريا تفوق تلك الموجودة بالحليب المجفف بالأسطوانات نظرا لانخفاض حرارة التجفيف، ومن أكثر أنواع البكتيريا شيوعا في الحليب المجفف بطريقة الرذاذ الأنواع المقاومة للحرارة **Thermoduric** من جنس ***Streptococcus*** وخصوصاً ***Streptococcus bovis*** و ***S. durans*** و ***S. salivarius* subsp. *thermophilus*** إضافةً إلى جنس ***Micrococcus*** وأهم أنواعه التي قد تتواجد ***Micrococcus luteus*** و ***Micrococcus varians*** كذلك قد تتواجد البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ ***Bacillus* spp.** كما أنه قد تتواجد أحياناً بكتيريا ***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*** والتي تسبب حالات التسمم الغذائي نظراً لأنها تفرز سم معوي خارجي **Enterotoxin** يبقى في الحليب المجفف حتى بعد هلاكها. وقد يتسبب الحليب المجفف بطريقة الرذاذ في ظهور حالات التسمم ببكتيريا ***Salmonella*** التي قد تلوث المنتج بعد المعاملة الحرارية والتجفيف وقبل عملية التعبئة لذا كان من الضروري إجراء الكشف عن هذه البكتيريا حيث تنص المواصفات على وجوب خلو المنتج النهائي منها ومن بكتيريا ***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus***.

وطبقا لإتباع توصيات قواعد الإجراءات والتي نصحت بإتباع معاملات حرارية مبدئية مختلفة بديلة فإن المجاميع الميكروبية للحليب المجفف بالرذاذ أصبحت مقتصرة على الأنواع المقاومة للحرارة من جنس ***Streptococcus*** وعلى البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ، وذلك متوقع فقط نتيجة للفعل الاختياري باستخدام المعاملات الحرارية المختلفة والتي أكثرها شدة تتم باستخدام حرارة **88**°م. ومن التطورات التي طرأت في مجال إنتاج الحليب المجفف بطريقة الرذاذ، استخدام المعاملة الحرارية الفائقة **UHT** للحليب مما أدى إلى إنتاج حليب مجفف شبه معقم وظهرت فقط حالات متفرقة من الملوثات نتيجة للتلوث بعد المعاملة الحرارية. إضافة لذلك رفعت درجة حرارة الهواء الداخل في عملية التجفيف بالرذاذ ولكن حتى الدرجات الحرارية الأعلى من **200**°م أخفقت في إزالة جميع البكتيريا المكونة للأبواغ. وتتم عملية أخذ العينات التحليل الميكروبيولوجي للحليب المجفف بالرذاذ من المناطق التالية:

1- الحليب الخام والحليب قبل التركيز.

2- الحليب المركز قبيل دخوله للمجفف بالرذاذ.

3- الحليب المجفف قبل الدخول للمرشح الحلزوني.

4- الحليب المجفف قبل التعبئة النهائية.

كما يتم أخذ عينات من الهواء في صالات الإنتاج وخصوصاً صالات التعبئة، أما الأماكن التي تتجمع فيها جزيئات الحليب المجفف وتكون هناك إمكانية لامتصاصها للرطوبة، فيتم أخذ مسحات منها بشكل منتظم. أما الاختبارات التي تجرى على العينات فتشمل ما يلي:

1- تقدير العدد القياسي للبكتيريا بطريقة الأطباق.

2- تقدير أعداد البكتيريا المتحملة للحرارة العالية **Thermoduric bacteria**.

3- تقدير أعداد بكتيريا القولون.

4- الكشف عن وجود بكتيريا ***Staphylococcus aureus* subsp. *aureus***.

5- الكشف عن وجود بكتيريا الـ ***Salmonella***.

ميكروبيولوجيا القشدة Cream:

القشدة هي ذلك الجزء من الحليب الغنى بدهن الحليب الذي يصعد إلى سطح الحليب عندما يترك ساكناً أو الذي ينتج عن فرز الحليب بالطرد المركزي عند استعمال جهاز الفراز. وتستعمل القشدة لأغراض مختلفة مثل الاستهلاك المباشر أو في صناعة الزبد أو المثلجات اللبنية. وهناك أنواع كثيرة للقشدة تختلف بشكل رئيسي في نسبة الدهن التي تحتويها، ومنها قشدة المائدة أو قشدة القهوة الخفيفة وتحتوي 18 – 20 % دهن، و قشدة الخفق الخفيفة وتحتوي 30 – 36 % دهن، وقشدة الخفق الثقيلة أو القشدة البلاستيكية وتحتوي على أكثر من 36 % دهن، وهناك القشدة الحامضية والتي تحتوي على 18 % دهن،......الخ.

إذاً فالقشدة تنتج إما بطريقة الترقيد أو بفرز الحليب بواسطة الفراز، وكثيرا ما يتم فصل القشدة في مزارع الإنتاج للحصول على ناتج يسهل معاملته من تعبة وتبريد وحفظ و تداول.........الخ، وهذه القشدة المنتجة لا تلق العناية الكافية. وتعتمد عملية إنتاج القشدة بطريقة الترقيد على مبدأ أنه عند ترك الحليب ساكناً فان قوة الجاذبية الارضية تجذب نحو الارض مكونات الحليب الثقيلة فتصعد الحبيبات الدهنية مكونة طبقة من الدهن علي السطح. وتشمل عملية الترقيد كل من:

(1) <u>طريقة الاواني الضحلة Shallow- pan</u>: حيث تستخدم أواني معدنية ضحلة قطرها بحدود 50 سم وارتفاعها 10 سم وتسع حوالي 15 لتر من الحليب. يوضع الحليب بعد حلبه مباشرة دون تبريد في هذه الاواني، وتتكون القشدة خلال حوالي 24- 36 ساعة.

(2) <u>طريقة الاواني العميقة Deep-setting</u>: حيث تستخدم أواني معدنية عميقة قطرها 25 سم وارتفاعها 50 سم وتسع حوالي 25- 40 لتر من الحليب. هذه الاواني مزودة بصمام لسحب الجزء غير الدهني، وغالباً ما توضع الاناء في حمام ثلجي، وتتكون القشدة خلال 24 ساعة.

أما في المصانع الحديثة يتم الحصول على القشدة بفرز الحليب باستعمال أجهزة الفرز الميكانيكية.

ويمكن تبريد قشدة الفراز الطازجة تبريدا سريعا حيث أن كميتها تكون اقل من كمية الحليب الكامل كما أن المحتوى الجرثومي لها اقل ويكن حفظها طازجة لمدة طويلة أما القشدة الناتجة من عملية الترقيد فتكون حامضية بسبب طول فترة الترقيد في جو الغرفة وتحتوي على أعداد كبيرة جداً من الأحياء المجهرية. ويجب تبريد القشدة المنتجة في المزرعة وحفظها على درجات حرارة منخفضة حتى تصنيعها وذلك للحد من الحموضة المتكونة والإقلال من نشاط الأحياء المجهرية المحللة للدهون مثل أنواع الجنس *Pseudomonas* الشائعة الانتشار وكذلك الأنواع المحللة للبروتينات وخصوصاً جنس *Bacillus*، إضافةً إلى الأنواع اللاهوائية المحللة للدهون من جنس *Clostridium* وخصوصاً *C. butyricum* و *C. bifermentans* و *C. sporogenes* و *C. acetobutylicum*.

والقشدة الحامضية (المرتفعة الحموضة نتيجة نشاط بكتيريا حامض اللاكتيك) بصفة عامة تحتوي على أعداد اقل من الأحياء المجهرية المحللة للدهون والبروتينات حيث أن الحموضة الزائدة تعتبر عامل مثبط لهذه الأنواع من الأحياء المجهرية.

ومن أهم الأحياء المجهرية الأُخرى التي تسببه فساد للقشدة الأعفان الخمائر خصوصا عند ترك القشدة مدة طويلة دون بسترة أو تبريد. وكثيرا ما تصل أوعية القشدة غير المبردة إلى المصنع والغطاء مرفوع وجزء من القشدة منسكب نتيجة قوة ضغط الغازات. وذلك يرجع إلى نمو وتكاثر الخمائر المكونة للغازات، ومن أهم الخمائر الملوثة للقشدة ***Candida lipolytica***، وبجانب ذلك فقد تعمل الخمائر عند نموها في وسط ملوث بأنواع أُخرى من الأحياء المجهرية على زيادة وضوح العيوب غير المرغوبة مثل النكهة الزنخة والمتعفنة والمرة. وإذا حفظت القشدة مدة طويلة دون تبريد فقد تظهر عليها الأعفان بأعداد كبيرة وأهم هذه الأعفان العفن المعروف بعفن الحليب الأبيض ***Geotrichum candidum***، وتكوين الحموضة يساعد على نمو الأعفان في القشدة حيث تظهر كنمو سطحي مسببة عيوب النكهة الزنخة وخصوصا إذا نمى عليها أنواع من أعفان ***Aspergillus*** و ***Penicillium*** ولما كانت الأعفان هوائية فان نموها يكون بغزارة على سطح القشدة، لذلك فإن أعداد الأعفان تتوقف على مساحة سطح القشدة المعرض للهواء بجانب درجة الحرارة ومدة حفظ القشدة ومدى تلوث القشدة أصلاً، كل ذلك له اثر كبير على نمو الأعفان، وتوجد بعض العوامل الأُخرى التي تحدد المحتوى الفطري للقشدة مثل الحموضة وارتفاع نسبة الدهن حيث تقل الهيفات في مثل هذا الوسط، والقشدة المتزنخة تحتوي غالبا على نمو فطري اقل من القشدة غير المتزنخة وذلك يرجح إلى الأثر المثبط لبعض الأحماض الدهنية المتحررة نتيجة نمو سابق لبعض الأحياء المجهرية مثل ***Pseudomonas fragi*** و ***Pseudomonas fluorescens*** وغيرها من الأحياء المجهرية المحللة للدهون.

ترجح ايجابية اختبار الفوسفاتيز للقشدة في كثير من الأحيان إلى نمو بعض الأحياء المجهرية المقاومة للحرارة مثل ***Bacillus. subtilis*** **subsp.** ***subtilis*** تفرز إنزيم الفوسفاتيز لذا يجب بسترة القشدة المعدة للصناعة على درجة حرارة أعلى من تلك المستعملة مع الحليب.

ميكروبيولوجيا الزبد Butter:

الزبد (أو ما يعرف محلياً بالزبدة) هو المنتج الدهني المُتحصل عليه من تجمع حبيبات الدهن التي في الحليب أو القشدة أو اللبن الرائب (الحقين) سواء بالطرق الآلية أو اليدوية مع إضافة أو عدم إضافة ملح الطعام والمواد الملونة المسموح بها.

<u>صناعة الزبد بالطريقة التقليدية:</u>

في هذه الطريقة يوضع اللبن الرائب (الحقين) داخل ما يسمى محلياً بالدبية أو الجعنان وهي عبارة عن ثمرة قرع (يقطين) كبيرة مجففة ومحفورة من الداخل لاستخراج اللب والبذور، ويسبق وضع اللبن الرائب سمط الوعاء (الدبية أو الجعنان) بالماء المغلي وتدخينه باستخدام أخشاب جافة من شجيرات معينة وذلك يضمن شروط صحية جيدة في هذه العملية كما يؤدي إلى إكساب الحقين الناتج الطعم المدخن المرغوب، وهذا ما يميز هذه الطريقة المستخدمة في اليمن عما هو مستخدم تقليدياً في بعض الدول الأخرى والتي تتم فيها وضع اللبن الرائب في قربة مصنوعة من جلد الحيوانات ثم تنفخ وتعلق وتخض للحصول على حبيبات الزبد، ومن أهم مشاكل هذه الطريقة تلوث القربة المصنوعة من جلد الحيوانات بالأحياء المجهرية، كما أن هواء الزفير المستخدم في نفخ القربة لإعطائها الشكل الذي يسمح بخضها يعتبر من المصادر لتلوث المنتج بالأحياء المجهرية المرضية للجهاز التنفسي. وفي كلا الطريقتين تتم عملية الخض لكي تتلاصق حبيبات الدهن وتتجمع في كتل صغيرة مكونة حبيبات الزبد، وبعد الانتهاء من عملية الخض تجمع الحبيبات الدهنية وتفصل. لكن في اليمن تتم هذه العملية للحصول على الزبد ليس بهدف تسويقه كما هو ولكن من أجل إنتاج السمن الذي تعتمد عليه الكثير من الأسر في الريف اليمني كمصدر دخل اساسي. كما يتم الحصول على الحقين الذي يستخدم لتغذية أفراد الأسرة.

الشكل رقم (212) ثمرة القرع (اليقطين) المعروفة محلياً بالدبية أو الجعنان المستخدمة لخض الزبد (يمين)، خض الزبد في قربة مصنوعة من جلد الحيوانات (يسار).

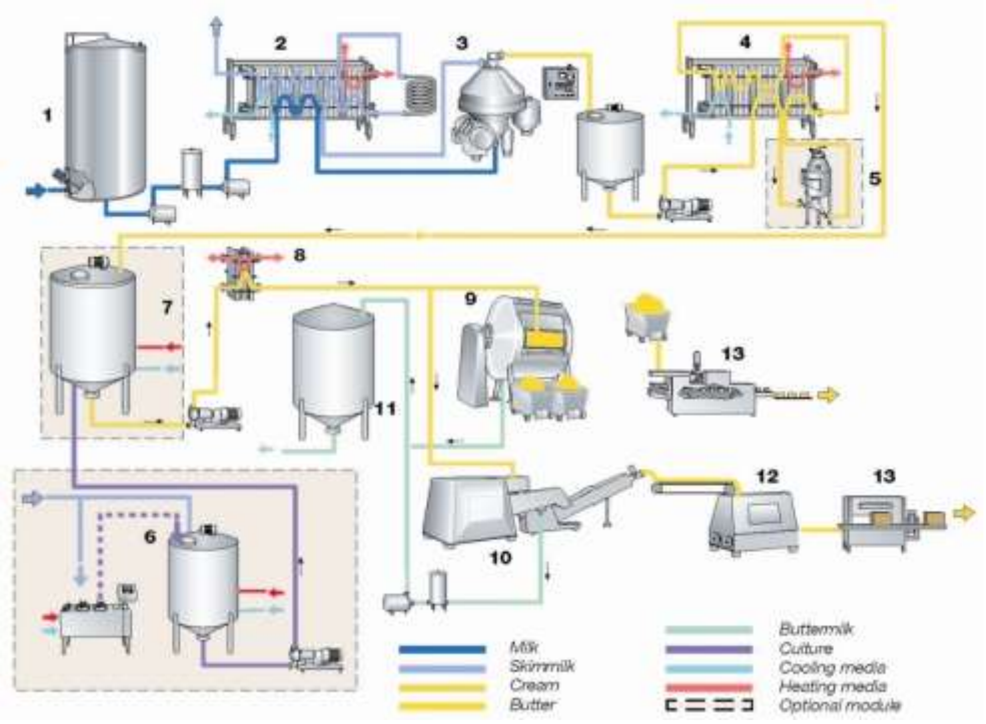
صناعة الزبد بالطريقة الحديثة (طريقة خضاض الدفعات والطريقة المستمرة):

وفي هذه الطريقة تستخدم القشدة الناتجة من فرز الحليب بواسطة جهاز الفراز الموضح سابقاً. وأول خطوة في تصنيع الزبد بالطريقة الحديثة تتمثل في معاملة القشدة حرارياً ثم إضافة البادئ للقشدة، حيث يصنع الزبد عادة من قشدة أُضيف إليها بادئ لإنتاج النكهة المرغوبة، وقد يتكون البادئ من *Lactococcus lactis subsp. lactis* المنتجة للحموضة و *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*، وكذلك *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*، وهذين النوعين منتجين للنكهة. ومن المزايا الأُخرى لاستعمال هذا البادئ إيقاف نشاط بعض الأحياء المجهرية غير المرغوبة وذلك إما بسبب الحموضة المتكونة التي قد تحد من نشاط بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وغيرها من الأحياء المجهرية أو بسبب إنتاج بكتيريا البادئ لبعض المواد الأُخرى المثبطة لنمو العديد من الأحياء المجهرية المحللة للدهون.

ثم تتم إضافة المواد الملونة المسموح بها (مثل الكركم أو الكاروتين أو الاناتو) حيث تضاف بمعدل 1 ملليلتر لكل واحد كيلوجرام قشدة مصنعة من حليب جاموسي أو 1 ملليلتر لكل 3 كيلوجرام قشدة مصنعة من حليب بقري، وقد لا تلون القشدة الناتجة عن الحليب البقري في الشتاء لارتفاع نسبة الكاروتين وزيادة تركيز اللون الأصفر فيها. ويتم إضافة المواد الملونة المسموح بها بهدف توحيد لون الزبد الناتج على مدار السنة.

تتم بعدها خض القشدة بواسطة الخضاض وعند تكون حبيبات الزبد يتم فصل حليب الخض وغسل الزبد الذي يُجرى بهدف التخلص من بقايا حليب الخض وكذلك الروائح غير المرغوبة، كما تساعد عملية الغسل علي تحسين قابلية حفظ الزبد وتصلب حبيبات الزبد. وتتم عملية غسل الزبد بكمية من الماء الصالح للشرب تساوي كمية حليب الخض الذي تم فصله وتصريفه. كما قد يتم تمليح الزبد وتتراوح نسبة الملح بين 1 – 3 % من وزن الزبد، ويساعد الملح علي تحسين طعم الزبد وقوامه كما أن إضافة الملح للزبد المملح يقوم بعمل المادة الحافظة أو المثبطة لنمو وتكاثر الكثير من الأحياء المجهرية خصوصاً الخمائر والأعفان (التي تتمكن من النمو في وسط نشاطه المائي منخفض مثل الزبد). وإذا حفظ الزبد على درجات حرارة منخفضة جداً، عندها لا تستطيع الأحياء المجهرية أن تنمو وتتكاثر وبالتالي لا تفرز إنزيم اللايبيز وبالتالي لا يحدث تحرر للأحماض الدهنية غير الذائبة التي لها علاقة بتلف الزبد، وبالرغم من ذلك كله فان بعض الأحياء المجهرية تعمل على سرعة تدهور صفات الزبد.

بعد ذلك تتم عملية عصر الزبد وذلك أما بتشغيل خضاض الدفعات من جديد لفترة زمنية قصيرة أو من خلال خزان مزود بناقل لولبي في الطريقة المستمرة، وذلك كي يكتسب الزبد قوامه المطلوب والتخلص من الرطوبة الزائدة فيه وتوزيع الملح والماء بصورة متجانسة في الزبد. ثم يقطع الزبد ويغلف ويخزن مبرداً لحين تسويقه.



1- استلام الحليب، 2- التسخين المبدئي والبسترة، 3- فرز القشدة، 4- بسترة القشدة، 5- إزالة الروائح تحت التفريغ (اختياري)، 6- تحضير مزرعة البادئ (اختياري)، 7- إنضاج القشدة وتحميضها (اختياري)، 8 - معاملة حرارية، 9- خض الزبد بطريقة الدفعات، 10- خض الزبد بالطريقة المستمرة، 11- تجميع حليب الخض، 12- خزان بناقل لولبي (لعملية عصر الزبد)، 13- مكينة تعبئة.

الشكل رقم (213) يوضح العمليات الكاملة لإنتاج الزبد في المصانع الكبرى، عن (Bylund, 1995).

ويعتبر الزبد من اقل المنتجات اللبنية مناسبة لنمو الكثير من الأحياء المجهرية وذلك يرجع إلى تركيبه الكيميائي وارتفاع نسبة الدهن فيه فهو لا يتأثر إلا بعدد محدود من أجناس وأنوع محددة من الأحياء المجهرية، كما أن كمية اللاكتوز فيه قليلة جدا وهو المادة الأساسية اللازمة لنشاط بكتيريا حامض اللاكتيك، بالإضافة إلى قلة نسبة الماء فيه، ومن المعروف أن الماء يعتبر العامل الأساسي اللازم لنمو ونشاط الأحياء المجهرية، علاوة على وجود الماء فيه على هيئة قطرات صغيرة أو مغلفة لحبيبات الدهن وليس في وسط حر كما هو الحال في الحليب. كما أن إضافة الملح للزبد المملح يقوم بعمل المادة الحافظة أو المثبطة لنمو وتكاثر الكثير من الأحياء

المجهرية خصوصاً الخمائر والأعفان (التي تتمكن من النمو في وسط نشاطه المائي منخفض مثل الزبد). وإذا حفظ الزبد على درجات حرارة منخفضة جداً، عندها لا تستطيع الأحياء المجهرية أن تنمو وتتكاثر وبالتالي لا تفرز إنزيم اللايبيز وبالتالي لا يحدث تحرر للأحماض الدهنية غير الذائبة التي لها علاقة بتلف الزبد، وبالرغم من ذلك كله فان بعض الأحياء المجهرية تعمل على سرعة تدهور صفات الزبد.

إن أكثر الأجناس التي تسبب فساد الزبد أو تدهور صفاته جنس *Pseudomonas*، وجنس *Achromobacter*، كذلك فإن الخمائر والأعفان عموما تعتبر من الأحياء المجهرية المسببة لفساد الزبد، كما وجد أن بعض أنواع بكتيريا القولون وجنس *Micrococcus* لها القدرة على تحليل الدهون والبروتينات. وتلعب الأحياء المجهرية المحللة للبروتين دورا هاما في الحكم على صفات الزبد بطريقة غير مباشرة إذ يوجد ارتباط بين الأعداد الميكروبية الكلية في الزبد وبين أعداد البكتيريا المحللة للبروتين وقوة حفظ الزبد فوجودها بأعداد كبيرة يعتبر دليلا على رداءة الشئون الصحية أثناء الإنتاج والتصنيع أو أثناء تداول الزبد. يعتبر الخضاض أكثر الآلات المستعملة التي تحدث تلوثاً شديداً للزبد خاصة بالخمائر والأعفان ولاسيما إذا كان مصنوعاً من الخشب إذ أن الأعفان تتمكن من النمو في الخشب إلى عمق يتراوح بين 1 – 2 سم عن السطح لذا يجب تعقيم الخضاض باستعمال درجات حرارة مرتفعة جداً لوقت مناسب حتى تستطيع الحرارة الوصول إلى هذا العمق. كما أن عملية الخض تؤثر على المحتوى الميكروبي للزبد إذ يحدث تكسير للمجاميع الميكروبية التي توجد وبذلك يزداد العد القياسي هذا بجانب الزيادة الناتجة عن التلوث من الخضاض. وعند استعمال قشدة مبسترة فإن الزبد الناتج لا يحتوي على أعداد معنوية من الأعفان والخمائر غير أن وجود أي من هذه الكائنات يدل على حدوث تلوث بعد عملية البسترة.

ويصنع الزبد عادة من قشدة أُضيف إليها بادئ لإنتاج النكهة المرغوبة، وقد يتكون البادئ من مجموعتين من البكتيريا هما *Lactococcus lactis subsp. lactis* المنتجة للحموضة و *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* (*L. dextranicum*)، وكذلك *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (*L. citrovorum*)، وهذين النوعين الأخيرين منتجين للنكهة، ومن المزايا الأُخرى لاستعمال هذا البادئ إيقاف نشاط بعض الأحياء المجهرية غير المرغوبة وذلك إما بسبب الحموضة المتكونة التي قد تحد من نشاط بكتيريا *Pseudomonas fluorescens* وغيرها من الأحياء المجهرية أو بسبب إنتاج بكتيريا البادئ لبعض المواد الأُخرى المثبطة لنمو العديد من الأحياء المجهرية المحللة للدهون.

ويمكن تلخيص أهم المشاكل الميكروبية التي تنتج عن تلوث الزبد بالأحياء المجهرية بما يلي:

أ- عيوب النكهة:

و من أهم الأحياء المجهرية التي تسبب هذا النوع من العيوب الخمائر مثل *Candida spherica* و *Candida pseudotropicalis* اللتان تتسببان بظهور النكهة المتخمرة، وكذلك تظهر النكهة المتزنخة التي قد يسبقها تكون نكهة تعرف بنكهة الفاكهة نتيجة تلوث الزبد ببكتيريا *Pseudomonas fragi* وكذلك *P. fluorescens* (و/ أو) خميرة *Candida lipolytica*، كما أن أنواع من بكتيريا *Pseudomonas* قد تتسبب أيضاً بتكون النكهة العفنة **Putrid** أو النكهة السمكية **Fishiness** والتي تحدث بسبب تحليل الأحياء المجهرية لمادة الليسيثين الموجودة في دهن الزبد وتتسبب بالتالي بتحرر مادة الأمين ثلاثي الميثايل **Trimethylamine** التي تمتلك رائحة تشبه رائحة السمك.

ب- عيوب اللون:

تعتبر الخمائر و الأعفان أهم الأحياء المجهرية التي تسبب ظهور عيوب اللون في الزبد، حيث تتسبب أجناس *Mucor*، *Cladosporium*، *Alternaria*، *Aspergillus* و *Rhizopus* ظهور بقع بنية أو سوداء، في حين أن عفن *Penicillium* يسبب ظهور بقع خضراء اللون، أما *Geotrichum candidum* فقد يتسبب في ظهور بقع صفراء أو برتقالية أو شفافة في الزبد الملوث به، أما خمائر *Torula* و *Monilia* فتسبب تبقع الزبد باللون الأحمر أو الأسود.

السمن Ghee:

السمن Ghee هو الناتج الذى يحصل عليه من الزبد بعد التخلص مما به من ماء ومواد صلبة لادهنية عن طريق تسييح الزبد بالحرارة. ويعد السمن كما أسلفت مصدر دخل اساسي تعتمد عليه الكثير من الأسر في الريف اليمني.

ولإنتاج السمن يتم نقل الزبد المتحصل عليه من عملية الخض التي سبق وصفها إلى وعاء التسخين ويضاف له الملح بنسبة 3 % من وزنه بهدف رفع درجة حرارة الغليان والمساعدة على ترسيب البروتينات وفصل الدهن، أما في الطرق التقليدية اليمنية يتم تدخين الوعاء المستخدم في التسخين، بعدها يتم إضافة كمية بسيطة من طحين الذرة الصفراء ومسحوق بذور الحُلْبَةٌ Fenugreek، ثم تجرى عملية إسالة الزبد علي نار هادئة، بعدها يرفع شدة اللهب المستخدم في التسخين مع التقليب المستمر لمحتويات وعاء التسخين لتوزيع الحرارة بانتظام وتحاشي فوران المحتويات. وعند التسخين تتكون رغوة علي سطح السائل المسخن تتسبب في حدوث عكارة ما تلبث أن تزول تدريجياً عندما يبدأ السائل في الغليان (عند وصول درجة حرارته إلى 105°م)، ونتيجة لاستمرار التسخين تتبخر الرطوبة الموجودة في الزبد كما تترسب البروتينات والمواد الصلبة غير الدهنية في الزبد في قاع وعاء التسخين وهي ما تعرف بالمورتة (أو ما تسمى محلياً بقشطة السمن)، وباستمرار التسخين تتكون رغوة مفاجئة على هيئة فقاقيع صغيرة تعرف برغوة التسوية عند وصول درجة حرارة السمن إلى ما بين 115 - 125°م، وهنا يتم إبعاد الوعاء عن اللهب ويترك هادئاً حتي يتم اكتمال ترسيب المورتة (التي تكون ذات لون اصفر أو احمر أو بنى الخفيف) بقاع الاناء، ثم يتم الحصول على السمن.

والسمن وسط غير ملائم لنمو الأحياء المجهرية نتيجة عدم احتوائه على الرطوبة اللازمة لنموها، وبالتالي فإن فساد السمن وتلفه لا يكون ميكروبياً وإنما بسبب كيميائياً.

ميكروبيولوجيا المثلجات اللبنية (القشدية) Ice-Cream:

المثلجات اللبنية Ice-Cream هي منتج مثلج مبستر يحضر مزيجه من منتجات الألبان ومواد التحلية الطبيعية، ويمكن إضافة المطعمات والنكهات والمواد الملونة والمثبتة ومواد الاستحلاب المصرح بها لتعطيه قوام ناعم عند الخلط والتجميد، كما يجوز إضافة مواد غذائية مثل البيض والفاكهة والمكسرات على أن لا تقل نسبة الفاكهة الطازجة أو المجففة عن 5 % والمكسرات عن 2 % بالوزن، وتميز المثلجات باسم الفاكهة والمكسرات المضافة. وهناك منتجات أُخرى يمكن أن تندرج في هذا المجال مثل المثلجات اللبنية مستبدلة الدهن وتدعى بالمثلجات اللبنية المقلدة Imitation Ice-Cream أو Mellorine حيث يتم استبدال دهن الحليب بالدهن النباتي، كما يمكن استبدال بروتين الحليب فيها من مصدر آخر غير لبني.

كذلك هناك ما يسمى بالمثلجات الحليبية Ice-Milk وتشابه في تركيبها المثلجات اللبنية إلا أنها أقل في نسبة الدهن وتتكون بصوره عامة من الحليب ولا تحتوى على أي دهن مضاف عدا دهن الحليب. وهناك ما يسمى بشربات الفواكه المثلجة Fruit sherbet وهي عبارة عن منتج مثلج مبستر يحتوي على عصير الفاكهة الطبيعية أو المطعمات والسكر والمثبتات بصورة رئيسية كما تحتوي على نسبة من منتجات الألبان. كذلك هناك ما يسمى بالمثلوجة أو المثلجات المائية Ices وتشابه الشربات المثلجة إلا أنها لا تحتوي على أي نسبة من منتجات الألبان. وهناك أنواع كثيرة لا يتسع المجال لسردها جميعاً مثل الموس Mousse الذي ينتج من تجميد القشدة المخفوقة المضاف إليها السكر والمطعمات وقطع الفاكهة، كذلك الكاسترد المجمد Frozen custard أو ما يسمى بالبارفية Parfait الذي يمتاز باحتوائه على صفار البيض والفاكهة أو المكسرات، إضافة إلى البودنج Pudding الذي يتميز المثلجات اللبنية بالفاكهة في احتوائه على خليط من الفواكه بكمية وفيرة بالإضافة إلى صفار البيض.

والمثلجات اللبنية قد يتم استهلاكها مباشرة بعد تجميدها كما يحدث في المحلات التي تعد المثلجات اللبنية وتبيعها مباشرة وعندها تسمى المثلجات اللبنية الطرية Soft Ice-Cream، وكذلك هناك المثلجات اللبنية الصلبة Hard Ice-Cream والتي تنتج في المعامل والمصانع الكبرى التي تسوق هذه المثلجات بعد تصليبها بالتجميد.

المكونات الداخلة في تصنيع المثلجات اللبنية:

1 – دهن الحليب:

يمنح دهن الحليب المثلجات اللبنية طعمها الغني بالدسم ويحسن قوامه ويمنحه النعومة المميزة كما يعمل على رفع سعراته الحرارية، إلا أن زيادته يرفع كلفة المثلجات اللبنية كما يتسبب

في زيادة نعومة المنتج مما يعيق عملية الخفق لخليط المثلجات اللبنية. ويتم إضافة دهن الحليب لخليط المثلجات اللبنية من مصادر مختلفة كالقشدة والزبد والدهن الحر (السمن)، كما يشكل الحليب المجفف الكامل والحليب المكثف مصدر للدهن لكن بنسبة أقل من المصادر السابقة.

وفي حالة المثلجات اللبنية المقلدة **Imitation Ice-Cream** أو **Mellorine** يتم استبدال دهن الحليب بالدهن النباتي، لكن في هذه الحالة يجب الإشارة إلى ذلك بوضوح في البيانات الموجودة على غلاف عبوة المثلجات.

2 – <u>المواد الصلبة غير الدهنية</u>:

تساعد المواد الصلبة غير الدهنية على تحسين الطعم والقوام كما تودي إلى زيادة الريع **Overrun**، لا ان زيادتها عن الحد المعقول يتسبب في ظهور ملمس خشن في المنتج النهائي. ومن أهم مصادر المواد الصلبة غير الدهنية الحليب المخفف الفرز، والحليب المكثف الفرز المحلى أو غير المحلى، كما يشكل حليب الفرز والشرش مصادر المواد الصلبة غير الدهنية بنسبة أقل لارتفاع نسبة الرطوبة فيها، كما أنه عند إضافة القشدة (كمصدر للدهن) فيجب الأخذ بعين الاعتبار نسبة المواد الصلبة غير الدهنية فيها.

3 – <u>السكر</u>:

السكر مصدر للطعم الحلو في خليط المثلجات اللبنية، وهو من أرخص المكونات الداخلة في تكوين المثلجات اللبنية مما يقلل من الكلفة حيث يضاف بنسبة تقارب 14 %، إلا أنه يعمل على خفض درجة تجمد الخليط، مما يؤدي إلى زيادة فترة التجميد. كما يقلل من القابلية للخفق ويؤدى إلى ظهور ملمس خشن في المنتج النهائي. ويمكن استخدام كل من سكر القصب أو البنجر أو السكر المحول أو سكر الذرة أو العسل الذي يستخدم في صناعة المثلجات اللبنية الفاخرة. كما يمكن استخدام المحليات الصناعية المستخدمة في إنتاج في المثلجات اللبنية الخاصة المستخدمة لمرضى السكر.

4 – <u>المواد المثبتة **Stabilizers**</u>:

تتميز المواد المثبتة للقوام بقدرتها على الاحتفاظ بالماء ومنع انفصال الطبقة المائية مما يجعلها تقاوم الانصهار السريع، كما تعمل على تكوين بلورات ثلجية صغيرة عند إجراء عملية التجميد، وتساهم في زيادة لزوجة المزيج مما يكسب المثلجات اللبنية نعومة وقوام مرغوبين. ومن أهم المواد المثبتة المستخدمة الجيلاتين، الصمغ العربي، صمغ بذور الخروب، صمغ الجوار، والجينات الصوديوم والكارجنين **Carrageenin** ومركب كربوكسي مثيل سيليلوز **CMC**.

5 – <u>المواد المستحلبة **Emulsifiers**</u>:

تقوم بمنع انفصال الدهن وتجمعه وتساعد على توزيعه بصورة متجانسة، ومن أمثلة المواد المستحلبة المستخدمة في صناعة المثلجات اللبنية صفار البيض والليثيين.

6 – **المواد المكسبة للطعم والرائحة:**

تضاف هذه المواد بهدف إكساب المثلجات اللبنية طعم ورائحة معينين. وقد تكون هذه المواد من مصدر طبيعي أو صناعي ومن أمثلتها قطع الفاكهة أو عصيرها أو خلاصة الفاكهة (زيت الفاكهة مذابة في الكحول) أو الفانيليا أو الكاكاو أو المكسرات.

7 – **المواد الملونة:**

تضاف المواد الملونة بهدف تحسين مظهر ولون المثلجات اللبنية المنتجة. وهناك العديد من المواد الملونة التي يجب عند استخدامها في صناعة المثلجات اللبنية أن تكون من المواد المصرح باستخدامها وبالكميات التي لا تتجاوز الحدود المسموح بها.

تصنيع المثلجات اللبنية:

إن أول مرحلة في عملية صناعة المثلجات اللبنية تتمثل في إعداد خليط المثلجات اللبنية وإجراء حساب مكونات الخليط، والمكونات العامة لخليط المثلجات اللبنية يمكن توضيحها من خلال الجدول رقم (42)، في حين يوضح الجدول رقم (43) يوضح بعض التراكيب المقترحة لإنتاج مثلجات لبنية صلبة Hard-Frozen Ice-Cream.

جدول رقم (42): يوضح المكونات العامة لخليط المثلجات اللبنية

المكونات	النسبة المئوية %
دهن الحليب	10 % - 16 %
المواد الصلبة غير الدهنية (SNF)	09 % - 12 %
السكر	10 % - 14 %
شراب الذرة (السكر السائل)	04 % - 05 %
المواد المثبتة للقوام (المثبتات)	0 % - 0.40 %
مواد الاستحلاب	0 % - 0.25 %
الماء	55 % - 64 %

جدول رقم (43): يوضح بعض التراكيب المقترحة لإنتاج مثلجات لبنية.

المكونات	النسبة المئوية %						
	1	2	3	4	5	6	7
دهن الحليب	10.0	11.0	12.0	13.0	14.0	15.0	16.0
المواد الصلبة غير الدهنية	11.0	11.0	10.5	10.5	10.0	10.0	9.5
السكر	10.0	10.0	12.0	14.0	14.0	15.0	15.0
شراب الذرة (السكر السائل)	5.0	5.0	4.0	3.0	3.0	-	-
المواد المثبتة للقوام (المثبتات)	0.35	0.35	0.30	0.30	0.25	0.20	0.15
مواد الاستحلاب	0.15	0.15	0.15	0.14	0.13	0.12	0.10
المواد الصلبة الكلية للخليط	36.5	37.5	38.95	40.94	41.38	40.32	40.75

بعد إجراء حساب مكونات الخليط وإعداد خليط المثلجات اللبنية، الخطوة الأولى تتضمن خلط المكونات وتسخينها تسخينا مبدئيا ليساعد على خلط الدهن وإذابة السكر. وبعد عملية خلط المكونات تتم بسترة الخليط وتشترط التشريعات استخدام درجات من الحرارة لا تقل عن 65.6°م لمدة 30 دقيقه أو 71.1°م لمدة 10 دقائق أو 79.4°م لمدة 15 ثانية. ويتم استخدام الدرجات الحرارية العالية للتغلب على الأثر الناشئ من زيادة المواد الصلبة الكلية في الخليط الذي يعمل على وقاية الأحياء المجهرية من الحرارة. وتؤدى البسترة إلى القضاء على أكثر من 90 % من المحتويات البكتيرية الموجودة أصلا إلا أن عملية التجنيس التي تلي ذلك تؤدي إلى زيادة أعداد البكتيريا نتيجة لتكسير الكتل البكتيرية المصاحبة لعناقيد الدهن. بعد ذلك يبرد الخليط بسرعة إلى درجة 2 – 4.5°م لإيقاف نمو البكتيريا أثناء عملية التعتيق aging وهذه العملية تستغرق من بضع ساعات إلى 24 ساعة تبعاً لنوع المثبت المستعمل، حيث تساعد فترة التعتيق علي زيادة قابلية الخفق وزيادة لزوجة المزيج مما يسرع بعملية التجميد وتحسين القوام. يجرى بعد ذلك تجميد الخليط مع خفقه في الوقت نفسا لمزجه بالهواء لكي يزداد حجمه وهذه الزيادة تعرف بالريع Overrun. ويتم التجميد في درجة -5°م وهناك بعض البكتيريا يقضى عليها نتيجة لتكوين البلورات الثلجية إلا أن معظمها يبقى حياً. أما المرحلة الأخيرة في صناعة المثلجات اللبنية فهي مرحلة التصليب Hardening التي تستغرق نحو 24 ساعة وهي تجرى في درجات حرارة من -18°م إلى -34°م قبل أو بعد التعبئة والتغليف، ولهذه العملية تأثير طفيف على الأحياء المجهرية. يلي ذلك عملية التخزين وأثناء ذلك يحدث انخفاض تدريجي كبير في الأعداد الميكروبية. ومن المهم أن نشير إلى أنه إذا ما حدث أي ارتفاع في حرارة المثلجات اللبنية إلى درجة حرارة -2.2°م قبل بيعها فتشرط القوانين في هذه الحالة ضرورة إعادة بسترتها مرة أُخرى.

وتتأثر المحتويات الميكروبية للمثلجات اللبنية بخطوات الصناعة حيث ينعكس اثر كل خطوة على مقدار تلك المحتويات سواء بالزيادة أو النقصان، كما تؤثر مكونات الخليط على المحتوى الميكروبي للمثلجات اللبنية وذلك كما يلي:

1- أهم المكونات أثراً على المحتوى الميكروبي في الخليط هي القشدة وتختلف الأعداد الميكروبية بها حسب طرق إنتاجها ودرجة تلوثها ويجب ضرورة عدم استعمال قشدة يزيد محتواها الميكروبي عن 100 ألف في الجرام ويجب أن تكون طازجة.

2- مشتقات الحليب الأُخرى مثل الحليب المركز أو المجفف التي تضاف خصوصا لتعديل المواد الصلبة اللادهنية في الخليط، وغالباً ما تسبب زيادة في محتويات الخليط الميكروبية لذا يجب استعمال أنواع عالية الجودة منها وألا يزيد عدد البكتيريا فيها عن 50 ألف في الجرام ومراعاة

الاهتمام بعدم التلوث من هذه المصادر حيث أن اغلب المجاميع بها هي من الأنواع المحبة والمقاومة للحرارة.

3- المواد المثبتة للقوام التي تضاف للخليط تعتبر اقل أهمية كمصدر للتلوث الميكروبي فيما عدا الأنواع غير النقية تماما من الجيلاتين حيث يصل أعداد البكتيريا بها إلى حوالي 100 ألف في الجرام واغلبها من جنس *Bacillus*، أما الخمائر و الأعفان فلا تزيد عادة عن 100 - 200 في الجرام وهي تباد بسهولة عند بسترة الخليط.

4- السكريات يكون لها اثر ظاهر في الصفات الميكروبية النهائية للخليط واهم هذه السكريات هو سكر القصب وسكر البنجر والجلوكوز وعسل النحل وسكر الذرة، وكثيرا ما تستعمل على هيئة محاليل تصل نسبة السكر فيها إلى 65 % وهي تؤدي إلى التلوث بالخمائر والأعفان نظراً لارتفاع ضغطها الاسموزي ولكن أعداد البكتيريا فيها تكون منخفضة بحيث لا تتعدى 20 - 200 في الجرام واهم المجاميع البكتيرية التي تتواجد مع السكريات هي الأنواع الهوائية المتجرثمة والمحبة للحرارة المرتفعة والحرارة المعتدلة ولكن لا تكون من الأنواع المكونة للحموضة وقد تتواجد بعض أنواع بكتيريا القولون وبكل تأكيد كما أشرت سابقاً أعداد من الخمائر و الأعفان.

5- مكسبات الطعم لها أهمية ملموسة كمصدر للتلوث الميكروبي حيث تتراوح أعداد البكتيريا في خلاصة الفانيليا من بضعة آلاف إلى عشرات الآلاف لكل سم^2 على عكس مواد التلوين وبعض مكسبات النكهة التي تذاب في الكحول والتي قد تحتوي على أعداد قليلة من البكتيريا وتعتبر الفاكهة والمكسرات من أهم مصادر تلوث المثلجات اللبنية لأنها عادة تضاف إلى الخليط بعد بسترته وقبل أو أثناء التجميد المبدئي أي بعد إتمام المعاملات الحرارية مما يؤدي إلى زيادة الأعداد الميكروبية للخليط زيادة كبيرة وذلك نتيجة عدم الاعتناء التام بتنظيف وغسيل الفاكهة التي تعلق بها بقايا التربة، كذلك يعد ماء الغسيل المستعمل والعاملين من مصادر التلوث للفاكهة. ويجب معاملة الفاكهة بالحرارة للإقلال من محتواها الميكروبي قبل إضافتها للخليط.

وبشكل عام تشير كثير من الدراسات إلى أنه من المثلجات اللبنية أمكن عزل أنواع مختلفة من البكتيريا وأهم هذه الأنواع كانت تتبع الأجناس التالية: *Pseudomonas* و *Alcaligenes* و *Escherichia* و *Enterobacter* و *Micrococcus* و *Streptococcus* و *Bacillus* و *Clostridium*.

الفصل الخامس عشر

ميكروبيولوجيا الألبان المتخمرة

Fermented dairy products Microbiology

تعتبر الألبان المتخمرة من أهم وأقدم منتجات الألبان التي عرفها الإنسان منذ القِدم، وقد اتفق المختصون على إطلاق اسم الألبان المتخمرة على أي منتج لبنى يحضر باستخدام الحليب الكامل الدسم أو الحليب الفرز أو الحليب الخض أو القشدة أو الشرش باستخدام بادئات محددة، على آن تظل الأحياء المجهرية المستخدمة في هذه المنتجات حية حتى تصل إلى المستهلك، كما يجب ألا يحتوى المنتج على أي بكتيريا مرضية. وتبعاً لهذا التعريف فإنه بمعاملة الألبان المختمرة بالحرارة بعد التخمير بحيث تؤدى إلى القضاء على الأحياء المجهرية المستخدمة كبادئ لا يصح اعتبار المنتج من الألبان المتخمرة بالرغم من أن الأسواق تتوافر بها العديد من الألبان المتخمرة المعاملة حرارياً بعد التخمير. وصناعة الألبان المتخمرة منتشرة في كل بلدان العالم، ويتميز كل شعب من الشعوب بنوع أو أكثر من الألبان المتخمرة ومن أشهر هذه المنتجات اليوغورت Yoghurt الذي يصنع في كثير من دول العالم ويعرف في بلادنا باسم الزبادي وهناك أيضاً اللبن الرائب وحليب الخض المتخمر Culture butter milk وهناك كذلك حليب الاسيدوفلس Acidophilus milk وفي دول القوقاز وروسيا ينتشر منتج الكيفير Kefir والكوميس Koumis وهناك الكثير من المنتجات اللبنية المتخمرة الأُخرى المنتشرة في كل دول العالم. والأساس في صناعة الألبان المتخمرة هو أن جميعها تشترك في أن الأحياء المجهرية إذا ما أضيفت إلى الحليب قامت بتخمير سكر اللاكتوز فيه منتجة حامض اللاكتيك علاوة على أنه في بعض المنتجات يتم تكوين بعض الأحماض الطيارة وأحياناً الكحول والغاز. وللألبان المتخمرة أهميتها الغذائية والطبية فهي تحتوى على جميع مكونات الحليب بصورة أكثر تركيزاً مما يكسبها قيمة غذائية عالية، كما أن الألبان المتخمرة تقدم للجسم مكونات الحليب المعقدة التركيب كالبروتينات في صورة مبسطة يسهل هضمها وتمثيلها، فقد اتضح أن الحليب الحامضي هو أسهل هضماً من الحليب الاعتيادي. وقد ثبت أن تناول الألبان المتخمرة يوميا ولفترة طويلة يساعد على التخلص من البكتيريا التعفنية التي تنمو في الأمعاء حيث أن وجود البكتيريا المستخدمة في إنتاج الألبان المتخمرة تسبب تكوين وسط حامضي في الأمعاء يمنع نمو ونشاط البكتيريا التعفنية. وقبل أن نخوض في تفاصيل إنتاج بعض أنواع منتجات الألبان المتخمرة لابد أن نتكلم بشيء من التفصيل عن التخمرات التي تحدث في الحليب والأحياء المجهرية المستخدمة في إنتاج المنتجات اللبنية المتخمرة (البادئات Starter Culture) مع التطرق لأنواع هذه البادئات وكيفية التعامل معها وما إلى ذلك من معلومات سوف تفيدنا بشكل كبير في معرفة أكبر لمنتجات الألبان المتخمرة.

التخمرات في الحليب ومنتجاته:

يعتبر الحليب وسطاً ملائم للتخمر حيث يحتوي الحليب على مواد ضرورية حتى لبعض أنواع الأحياء المجهرية التي تتميز بصعوبة نموها في الأوساط الأُخرى مثل بكتيريا *Lactobacillus*، إلا أن الحليب ليس دوماً وسطاً مثالياً بل يحتوي على بعض المواد المثبطة لنمو ونشاط الأحياء المجهرية، ويعتبر سكر اللاكتوز المصدر الرئيسي للكربون والطاقة في الحليب لذلك فان عمليات التخمر التي تحدث في الحليب تكون محددة بالأحياء المجهرية المخمرة لسكر اللاكتوز، أما في حالة التخمر البروبيونيكي **Propionic acid fermentation** فان تطعيم الحليب أو الشرش بالبروتين المتحلل يكون أمراً ضرورياً للحصول على تخمر سريع، كما يفتقر الحليب إلى عنصر المنجنيز الذي تحتاجه بكتيريا *Lactobacillus* لغرض الحصول على سرعة نمو عالية، في حين يعتبر الحليب مصدراً غنياً بالفيتامينات وعوامل النمو العضوية حيث أنه غني بصورة خاصة بالرايبوفلافين **Riboflavin** وحامض الاوروتك **Orotic acid**، ولذلك من النادر تدعيم الحليب بالفيتامينات أو المستخلصات حيث أن بروتينات الحليب تحتوي على جميع الحوامض الأمينية الأساسية لنمو الأحياء المجهرية.

كما تؤدي المعاملات الحرارية للحليب إلى تغير صفات الحليب كوسط غذائي للبادئ، فالحليب المعقم لمدة 15 دقيقة فقط يكون أفضل من الحليب المعامل على درجة حرارة 80°م لمدة 10 دقائق لغرض تخمر بكتيريا حامض اللاكتيك *Lactococcus*، وان معاملة الحليب بدرجة حرارة 62 - 72°م ولمدة 30- 40 دقيقة تؤدي إلى تحفيز بكتيريا البادئ للنمو، وذلك بسبب أن المعاملة الحرارية تعد من العوامل المسئولة عن تطاير الأوكسجين الذائب في الحليب والقضاء على المواد المانعة للنمو وتحليل البروتين جزئيا وكذلك تغير طبيعة بعض بروتينات الشرش وترسبها مما يؤدي إلى تنشيط نمو البادئ، كما أن هناك علاقة بين منع نمو الأحياء المجهرية المستخدمة كبادئ وتكوين مركبات الكبريت الطيارة السامة، ولذلك فإن تحفيز النمو الناتج عن المعاملة الحرارية يأتي نتيجة تطاير مركبات الكبريت بالحرارة ويمثل كلٍ من اللاكتوز والدهن وحامض الستريك بعض المركبات المهمة والقابلة للتخمر في الحليب.

إن الأحياء المجهرية تقوم بالتخمر لإنتاج الطاقة اللازمة لنموها وتكاثرها، وتؤدي هذه العمليات الأيضية إلى إنتاج مركبات جديدة تكسب المنتجات المتخمرة صفاتها المميزة. وكما سبقت الإشارة إلى أن اللاكتوز يعتبر المصدر الرئيسي للطاقة المطلوبة في العمليات الأيضية للأحياء المجهرية في الحليب، فالأحياء المجهرية تخمر سكر اللاكتوز في الحليب إلى جلوكوز وجالاكتوز وكلاهما قابل للتخمر إلى مركبات أُخرى . ويعتبر حامض البيروفيك مركب وسطي للعديد من التخمرات التي تحصل في الخلايا الحية.

<u>وتتلخص أهم التخمرات التي تحدث في الحليب أثناء صناعة الألبان المتخمرة فيما يلي:</u>

1- التخمر اللاكتيكي وفيه يتحول اللاكتوز إلى حامض اللاكتيك Lactic acid.
2- تخمر حامض الستريك ومن أهم نواتجه بعض المركبات الطيارة مثل Diacetyl و CO_2.
3- التخمر البروبيونيكي وفيه يتحول الجلوكوز الناتج عن تحلل اللاكتوز إلى حامض بروبيونيك Propionic acid.
4- التخمر الكحولي وفيه يتحول الجلوكوز الناتج عن تحلل اللاكتوز إلى كحول إيثانول.
5- التخمر البيوتريكي وأهم نواتجه حامض البيوتريك Butyric acid، وهذا التخمر نادر في الألبان المتخمرة.
6- تخمر بكتيريا القولون الغازي ومن أهم نواتجه الإيثانول وحامض الخليك و الأسيتوين وغازات الهيدروجين وثاني أكسيد الكربون CO_2 و H_2.

وتعتبر التخمرات الثلاث الأولى من التخمرات المرغوبة المفيدة في إنتاج الألبان المتخمرة أما التخمرات الثلاث الأخيرة فتعتبر من التخمرات غير المرغوب فيها أثناء صناعة هذه المنتجات (مع ملاحظة أن التخمر الكحولي يدخل في انتاج الكيفير Kefir والكوميس Koumis لأنها تُنتج باستخدام بادئات من بكتيريا حامض اللاكتيك والخمائر، إلا أن احتوائها على الكحول يجعلها من المنتجات التي لا تتناسب معنا في المجتمعات الإسلامية).

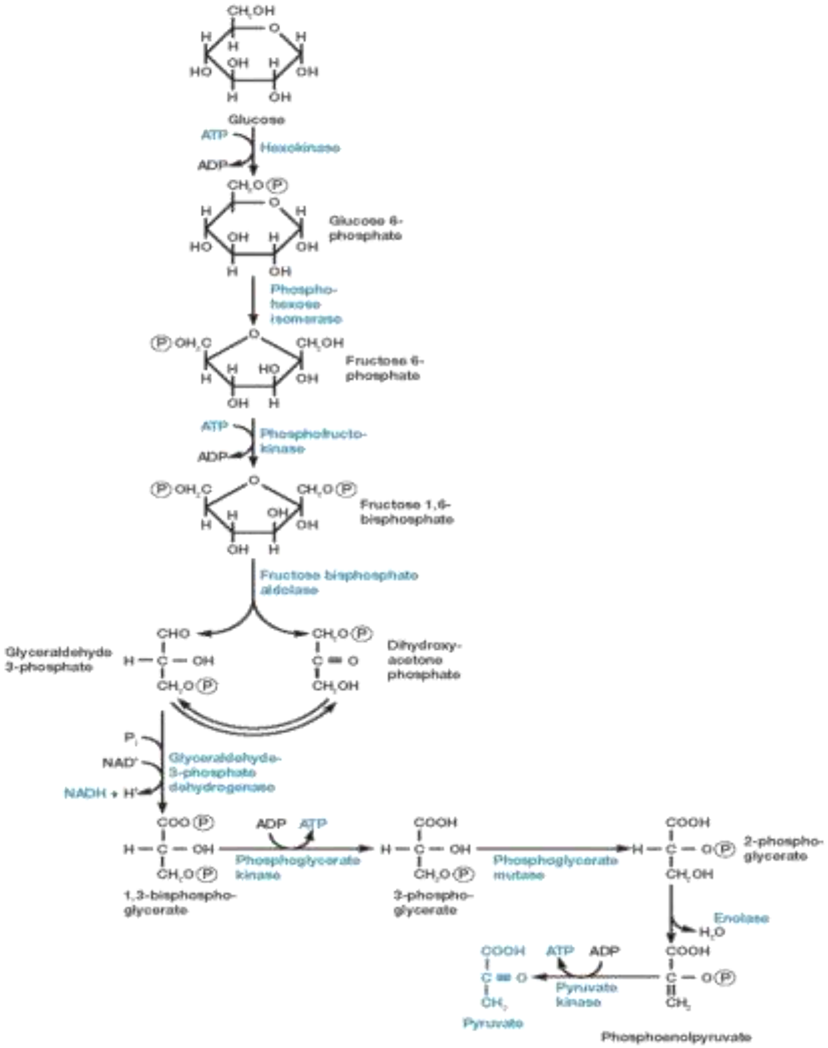
<u>تخمرات بكتيريا حامض اللاكتيك:</u>

بكتيريا حامض اللاكتيك العصوية *Lactobacillus* تقسم إلى مجموعتين اعتماداً على نواتج تخميرها للسكريات إلى مجموعتين الأولى متجانسة التخمر وتشمل الأنواع التي تنتج أساساً حامض اللاكتيك ومن أمثلتها ما يلي: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* و *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *L. lactis* وغيرها. أما المجموعة الثانية فتكون متباينة التخمر Heterofermentative، وتشمل الأنواع التي تنتج إضافة إلى حامض اللاكتيك مركبات أُخرى كحامض الخليك وثاني أكسيد الكربون والكحول الإيثلي ومركبات أُخرى ويعتبر النوع *Lactobacillus brevis* والنوع *L. fermentum* مثالاً لهذه المجموعة.

إن الفرق في عمليات التخمر يكمن في أن المجموعة الأولى تسلك مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات Hexose diphosphate pathway، أما المجموعة الثانية من بكتيريا حامض اللاكتيك العصوية *Lactobacillus* متباينة التخمر Heterofermentative فتسلك مسار مختلف تماماً يدعى مسار الفوسفوكيتوليز Phosphoketolase. وفيما يلي تفصيل لهذه المسارات الأيضية لبكتيريا حامض اللاكتيك:

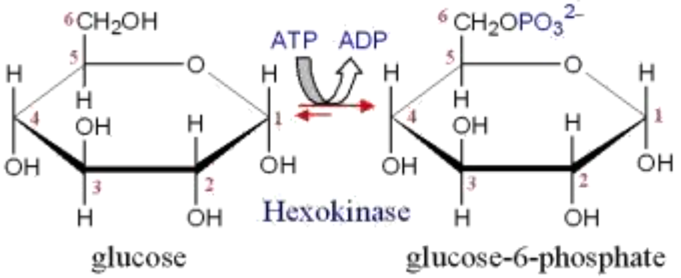
أولاً – **مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات Hexose diphosphate pathway:**

يعرف هذا المسار أيضاً بمسار إمبدن – مايرهوف – بارناس EMP، وهو من المسارات المهمة لتكسير السكريات السداسية لإنتاج البيروفات Pyruvate التي تستعمل في خطوات متتابعة أُخرى. والشكل التالي يوضح خطوات هذا المسار الذي يمكن تقسيم خطواته إلى مرحلتين، حيث أنه في المرحلة الأولى منه لا تحدث فيها عمليات أكسدة واختزال، إنما كل ما يجري في هذه المرحلة خطوات متتابعة لإنتاج المركب الوسطي جليسرالديهايد 3- فوسفات Glyceraldehyde-3-phosphate. أما المرحلة الثانية فيحدث فيها عمليات أكسدة واختزال ويتم إنتاج الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) ويتكون مركب البيروفات Pyruvate.

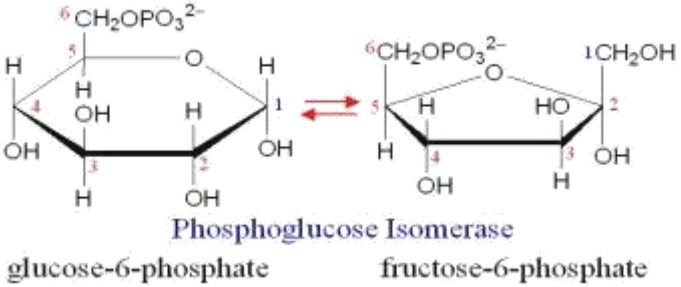


الشكل رقم (214) يوضح مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات، عن (Prescott, *et al.* 2002).

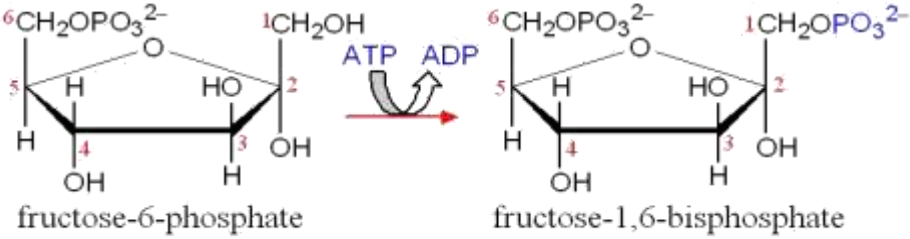
1- الخطوة الأولى من خطوات هذا المسار يحدث فيها أن يتفسفر الجلوكوز بواسطة الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP، حيث تضاف مجموعة فوسفات على ذرة الكربون رقم 6 في جزيئة الجلوكوز حيث يتحول هذا الأخير إلى جلوكوز-6- فوسفات في وجود إنزيم Hexokinase، وإنزيمات الـ kinase هي الإنزيمات التي تعمل على انتقال مجموعة الفوسفات الطرفية من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP إلى أي مجموعة هيدروكسيل للسكريات الخماسية والسداسية. وتعتبر هذه الخطوة خطوة تنشيط للجلوكوز، وهذا النوع من التفاعل يحدث بكثرة قبيل حدوث عمليات الأكسدة. وهذا ما يتضح من خلال المعادلة التالية:



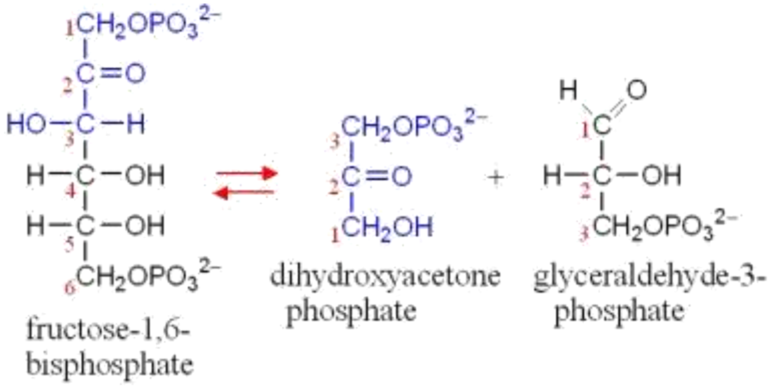
2- بعد حدوث عملية التنشيط السابقة، يتحول المركب الناتج إلى نظيره الفركتوز-6- فوسفات بواسطة إنزيم Phosphohexose isomarse [Phosphoglucose isomarse].



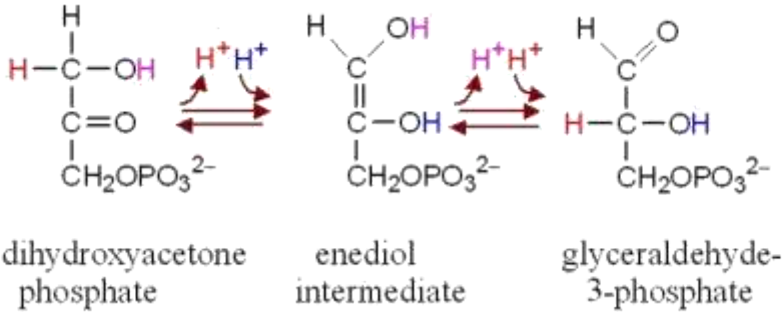
3- بعد حدوث عملية التحويل isomerization، تحدث عملية فسفرة ثانية بواسطة الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) حيث تضاف مجموعة فوسفات على ذرة الكربون رقم 1 في جزيئة الفركتوز-6- فوسفات حيث يتحول إلى الفركتوز-1،6- ثنائي الفوسفات في وجود إنزيم Phosphofructokinase.



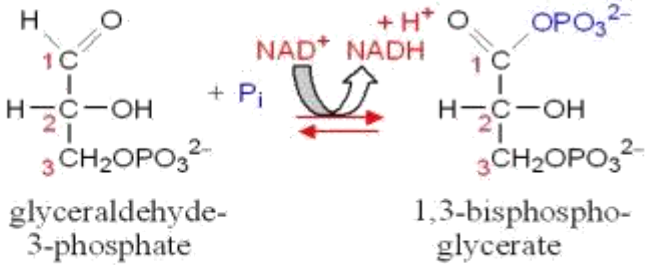
4- في هذه الخطوة ينقسم مركب الفركتوز-1،6- ثنائي الفوسفات إلى 2 من السكريات المفسفرة ثلاثية الكربون Triose phosphate هما أسيتون الفوسفات ثنائي الهيدروكسيل phosphate Dihydroxyacetone و جليسرالديهايد 3- فوسفات Glyceraldehyde-3-phosphate، وذلك في وجود الإنزيم المسمى Fructose bisphosphate aldolase.



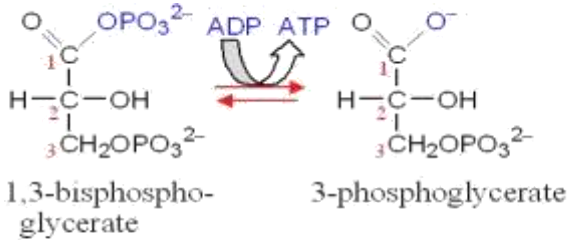
5- إن انقسام مركب الفركتوز-1،6- ثنائي الفوسفات إلى اثنين من مركبات السكريات الفوسفاتية ثلاثية الكربون يؤدي إلى تراكم أحدهم وذلك في وجود إنزيم Triose phosphate isomerase حيث يميل التوازن ناحية الجليسرالديهايد 3- فوسفات Glyceraldehyde-3-phosphate طالما ومسار HDP يسير بشكله الاعتيادي.



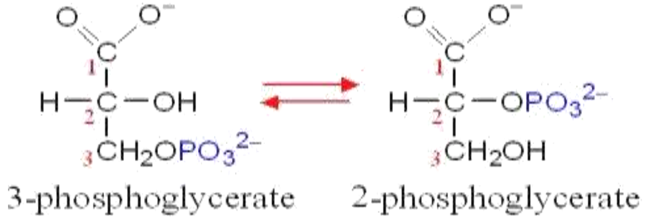
6- هذه الخطوة في مسار HDP هي خطوة أكسدة وفسفرة مركبة (كما يتضح من المعادلة التالية) في وجود إنزيم glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



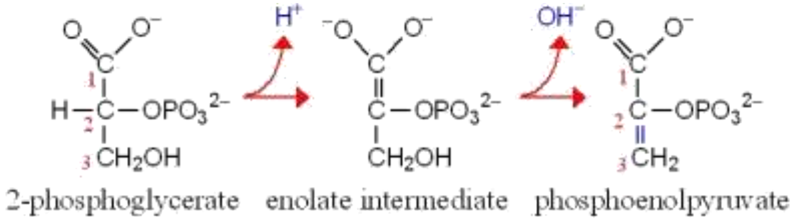
7- يفقـد المركـب 1,3-bisphosphoglycerate الغنـي بالطاقـة مجموعـة فوسـفات ليعطـي ATP فـي وجـود إنـزيم Phosphoglycerate Kinase، وهـذا النـوع مـن الفسـفرة يدعى بالفسفرة بمواد الأساس Substrate-level phosphorylation.



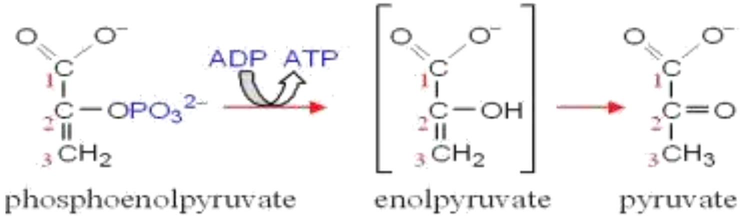
8- تتحول مجموعة الفوسفات في مركب 3-phosphoglycerate النـاتج عن الخطوة السابقة من الوضع 3 إلى الوضع 2، في وجود إنزيم Phosphoglycerate Mutase.



9- في الخطوة قبل الأخيرة في هذا المسار يتكون مركب phosphoenolpyruvate في وجود إنزيم Enolase (EC 4.2.1.11).

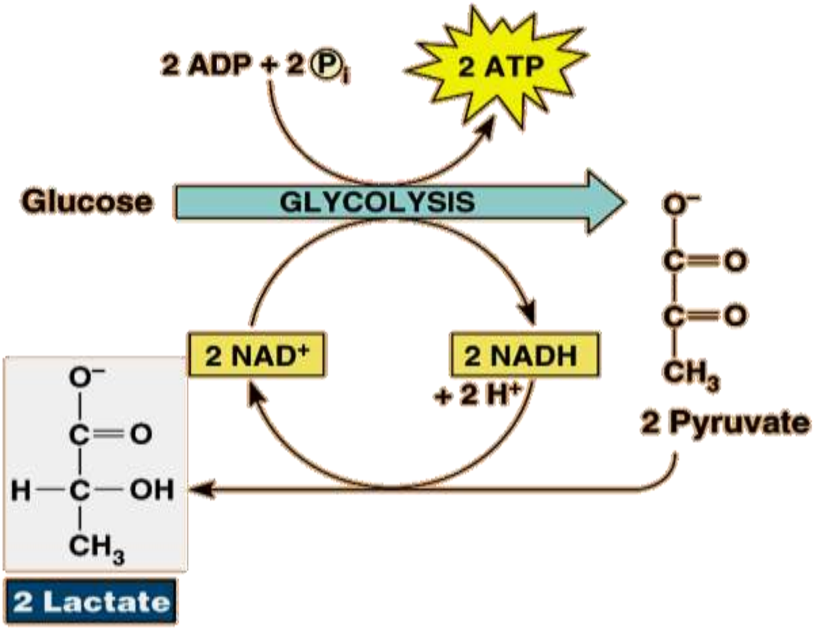


10- أمـا فـي الخطـوة الأخيـرة مـن هـذا المسـار فتنتقل مجموعـة الفوسـفات فـي مركـب phosphoenolpyruvate إلـــى الأدينـــوزين ثنـــائي الفوســـفات ADP بمســـاعدة إنـــزيم Pyruvate Kinase، حيث يتكون مركب البيروفـات Pyruvate وجزي أخـر مـن الأدينـوزين ثلاثي الفوسفات ATP.



إن مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات Hexose diphosphate pathway (HDP) يعطي كمية من الطاقة مقدارها 4 مول من مركب الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) لكل مول من الجلوكوز، لكن هناك 4 مول من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (ATP) تستهلك في الخطوات الأولى من هذا المسار لذلك يكون صافي الطاقة لكل مول من الجلوكوز 2 مول من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات، إضافة إلى 2 مول من مركب البيروفات Pyruvate الذي يعتبر مركب وسطي هام لكثير من الفعاليات الخلوية للأحياء المجهرية.

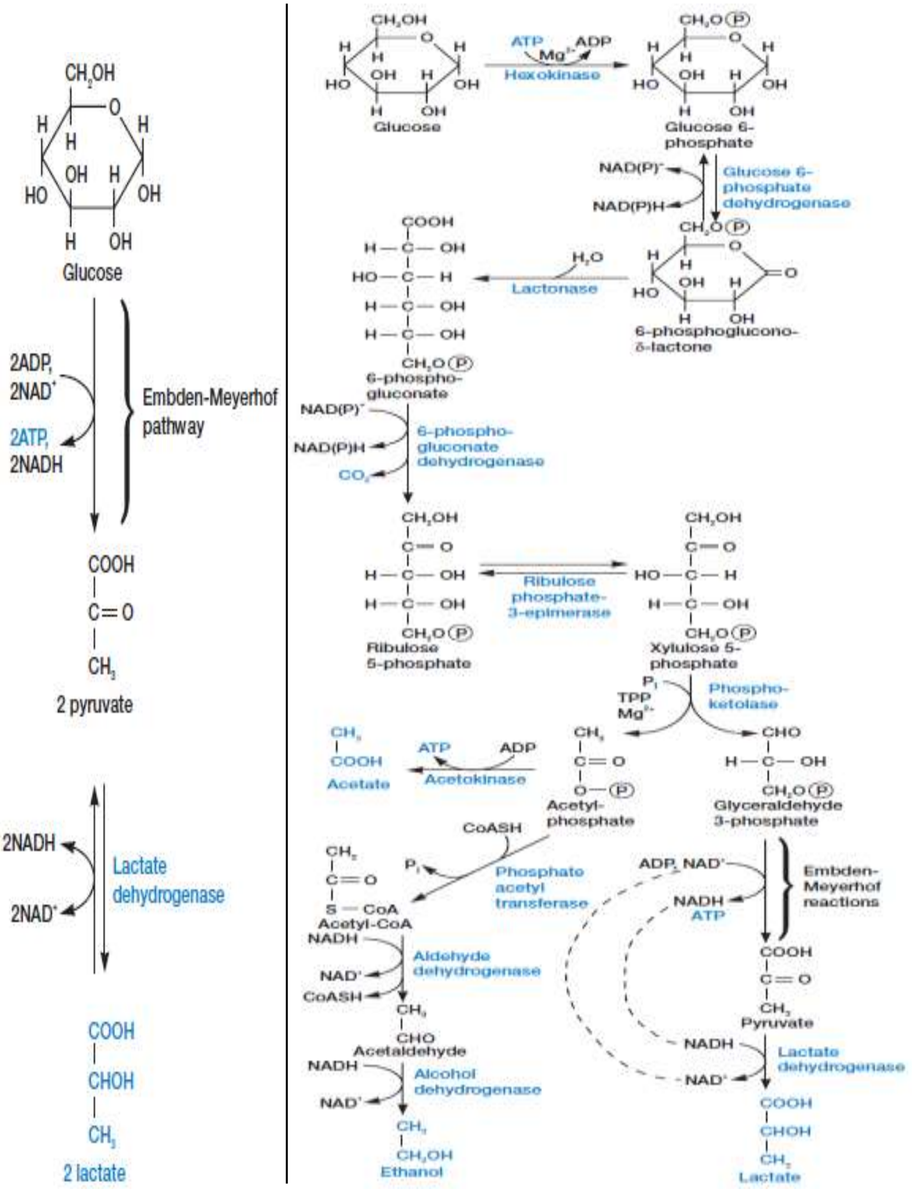
وإضافة إلى كل ما سبق يتكون 2 مول من النيكوتين أميد ثنائي النيوكليوتيد المختزل $NADH.H^+$، ونظراً لمحدودية محتوى الخلية من مركب النيكوتين أميد ثنائي النيوكليوتيد NAD الضروري في مختلف العمليات الحيوية، فإنه لابد وأن يؤكسد مرة أُخرى لكي يتم استخدامه من جديد، ويتم ذلك إما من خلال عمليات التخمر التي سيتم توضيحها لاحقاً وذلك في الظروف غير الهوائية أو من خلال السلسلة التنفسية في عملية الفسفرة التأكسدية التي يطلق عليها أيضاً الفسفرة المرافقة لنقل الالكترونات في الظروف الهوائية (وهي خارج نطاقنا هنا). والشكل التالي يوضح كيفية تحول البيروفات Pyruvate إلى حامض لاكتيك وذلك لأكسدة النيكوتين أميد ثنائي النيوكليوتيد المختزل $NADH.H^+$ لتحول إلى الصورة المؤكسدة كي يتم استخدامه كناقل للهيدروجين من جديد في التفاعلات الحيوية.



الشكل رقم (215) يوضح مخطط عام للتخمر اللاكتيكي، وعمليات الأكسدة والاختزال التي تحدث لمركب النيكوتين أميد ثنائي النيوكليوتيد (NAD).

ثانياً – <u>مسار الفوسفوكيتوليز Phosphoketolase pathway (PK)</u>:

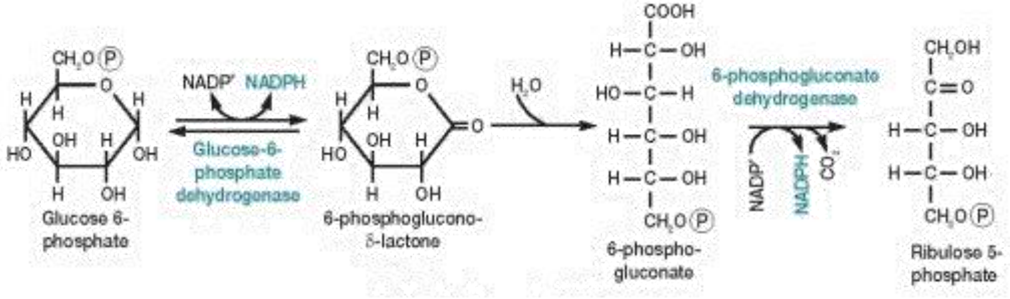
يوجد هذا المسار في عدد قليل من البكتيريا وبالذات بكتيريا حامض اللاكتيك متباينة التخمر *Lactobacilli* Heterofermentative. والشكل رقم (204) يوضح خطوات هذا المسار الذي يميزه إنزيم Phosphoketolase (EC 4.1.2.9)، الموجود أصلاً في بكتيريا حامض اللاكتيك العصوية *Lactobacillus* متباينة التخمر.



الشكل رقم (216) يوضح مسار الفوسفوكيتوليز Phosphoketolase pathway (PK) (يمين). مع مقارنته بعملية التخمر المتجانس لحامض اللاكتيك في مسار HDP (يسار)، عن (Prescott, *et al.* 2002).

إن الفــرق فــي عمليــات التخمــر لبكتيريــا حــامض اللاكتيــك متجانســة التخمــر Homofermentative، وبكتيريا حـامض اللاكتيـك متباينـة التخمـر Heterofermentative يكمن في امتلاك المجموعة الأولى لإنـزيم Fructose bisphosphate aldolase الذي يشطر مركــب Fructose-1,6-bisphosphate إلــى Dihydroxyacetone phosphate و Glyceraldehyde-3-phosphate، وبالتالي الناتج النهائي لعمليـة التخمر يكون جزيئين من حامض اللاكتيك لكل جزئية من الجلوكوز......أما المجموعة الثانية متباينة التخمر فلا تمتلك إنـزيم Fructose bisphosphate aldolase وبالتالي فإنـها لا تستطيع تكسير ذلـك السكر السداسي الحاوي على مجموعتين من الفوسفات إلى مركبات ثلاثية الكربون حاوية على الفوسفات Triose phosphate، وبدلاً عن ذلك فإنها تقوم بأكسدة المركب Glucose-6-phosphate إلى المركب 6-Phosphogluconate الذي تزال منه جزيئة CO_2 ليكوّن مركب Ribulose-5-P في وجود إنزيم Phosphogluconate dehydrogenase، وهذه الخطوات كالتالي:

إن التفاعل الأول في هذا المسار مشابه للتفاعل الحاصل في مسار HDP ثم يبدأ الاختلاف حيث يتأكسد الجلوكوز-6- فوسفات بواسطة النيكوتين أميد ثنـائي النيوكليوتيد فوسفات NADP لينتج D-glucono-lactone-6-P في وجود إنـزيم Glucose-6-P-dehydrogenase، وفـي الخطوة الثالثة يحدث تحلل مائي للمركــب النــاتج في وجــود إنـــزيم gluconolactonase ليكــون مركـــب 6-Phosphogluconate، بعـدها يتكـون مركـب الرايبولـوز-5-فوسـفات Ribulose-5-P مـن النـوع D فـي وجـود إنـزيم Phosphogluconate dehydrogenase وخلال التفاعل تزال جزيئة ثاني أكسيد الكربون CO_2.



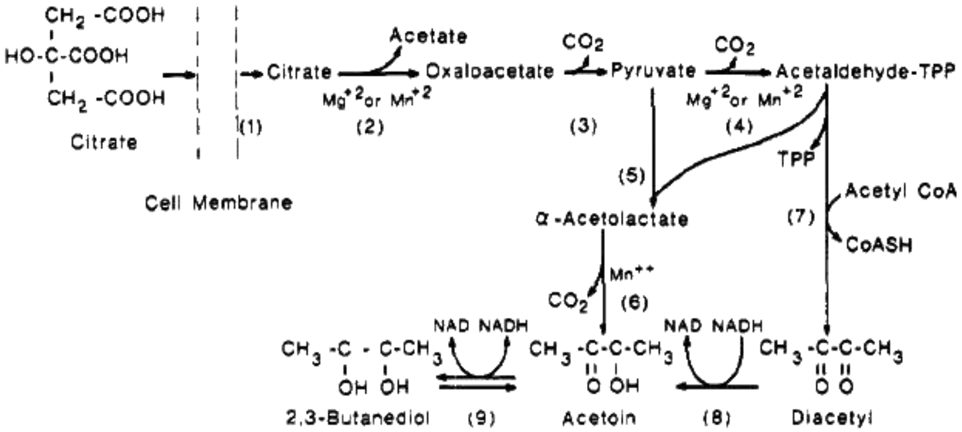
ومركــب Ribulose-5-P يكــون بمثابــة مــادة أســاس Substrate لعمــل إنـــزيم Phosphoketolase حيث ينـتج مركبي Acetyl phosphate و Glyceraldehyde-3-P، وهذا الأخير يتحول إلى حامض اللاكتيك مع تكون جزيئـة واحدة من ATP. أمـا مركب Acetyl phosphate فإنه يتحول لمركب Acetyl-CoA الذي يستقبل الإلكترونـات من NADH النـاتج

خلال الخطوات الأولى ليتحول إلى مركب **Acetaldehyde** الذي يستقبل الإلكترونات من جزيئة **NADH** الثانية (من نفس الخطوات التي ينتج عنها تكون مركب **Ribulose-5-P**) ليتحول إلى مركب الكحول الإيثيلي **Ethanol** دون تكون **ATP**.

وقد تقوم البكتيريا متباينة التخمر (**Heterofermentative**) بإنتاج حامض الخليك في هذا المسار من مركب **Acetyl phosphate** (الموضح سابقاً) والذي يتحول إلى حامض الخليك مع إنتاج جزيئة **ATP**، عند استعمالها للأوكسجين كمستقبل للإلكترونات، وبالتالي ينتج إضافة إلى حامض اللاكتيك مركبات أُخرى كحامض الخليك وثاني أكسيد الكربون.

<u>أيض السترات Citrate metabolism (تخمر حامض الستريك):</u>

على الرغم من احتواء الحليب على تركيز منخفض من السترات (**0.07 – 0.4 %**)، إلا أن أيض السترات يعتبر من الصفات المهمة للبكتيريا المنتجة للنكهة المستخدمة في بادئ الزبد وبعض الألبان المتخمرة الأُخرى، وتتكون نواتج أيض السترات من الخلات **Acetate**، ثنائي الأستيل **Diacetyl**، والأسيتوين **Acetoin**، والبيوتانديول **Butanediol**، وثاني أُكسيد الكربون CO_2 وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الإنزيمات المشاركة (1) **citrate permease**، (2) **citrate lyase**، (3) **oxaloacetic acid decarboxylase**، (4) **pyruvate decarboxylase**، (5) **α-acetolactate synthetase**، (6) **α-acetolactate carboxylase**، (7) **diacetyl synthetase**، (8) **diacetyl reductase**، (9) **acetoin reductase**.

الشكل رقم (217) يوضح المسار الأيضي لحامض الستريك بواسطة بعض أنواع بكتيريا البادئ.

<u>إن استخدام السترات من قِبل الأحياء المجهرية يتطلب:</u>

(1) إنزيم **Citrate permease** لغرض نقل السترات إلى داخل الخلية البكتيرية.

(2) إنزيم **Citrate lyase** لتحويل السترات إلى خلات وأوكزالواسيتيت **Oxaloacetate**.

(3) إنزيم **Oxaloacetic acid decarboxylase** لتكوين البيروفات **Pyruvate** من الأوكزالواسيتيت **Oxaloacetate**.

(4) إنزيم Pyruvate decarboxylase الذي ثاني أُكسيد الكربون ينزع CO_2 من البيروفات لتكوين مركب الأسيتالدهيد تعقبها خطوة يتم فيها تكوين Hydroxyethyl Thiamine Pyrophosphate الذي يتفاعل مع acetyl CoA في وجود إنزيم Diacetyl synthetase لتكوين مركب Diacetyl.

(5) اختزال مركب ثنائي الاستيل إلى الأسيتوين Acetoin في وجود إنزيم Diacetyl reductase، كما يمكن أن يتكون الأسيتوين عن طريق تحويل البيروفات في وجود إنزيم -α acetolactate synthetase إلى الفا اسيتولاكتات α-acetolactate والذي يتم نزع ثاني أُكسيد الكربون CO_2 منه عن طريق إنزيم α-acetolactate carboxylase ومن ثم تحويله إلى الأسيتوين.

(6) اختزال الأسيتوين إلى البيوتانديول Butanediol في وجود إنزيم Acetoin reductase.

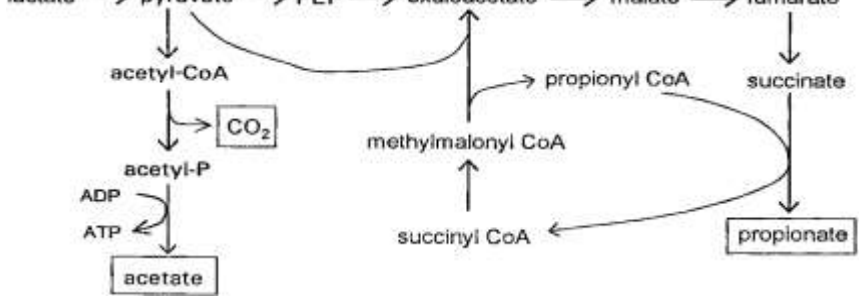
ويعتبر مركب ثنائي الاستيل Diacetyl من مكونات النكهة المهمة في العديد من منتجات الألبان المتخمرة وأنواع مختلفة من الجبن، كما أن الخلات تسهم في إعطاء النكهة لأنواع الجبن الهولندية، في حين أن غاز CO_2 يعتبر المسئول عن تكون العيون في هذه الأنواع من الجبن.

تخمر بكتيريا حامض البروبيونيك Propionic acid Bacteria Fermentation:

تستخدم بكتيريا حامض البروبيونيك كبادئات في العديد من العمليات التصنيعية مثل إنتاج الطعم والنكهة الخاصة والعيون في أنواع الجبن السويسري وإنتاج حامض البروبيونيك بصورة تجارية وإنتاج فيتامين B_{12}. وتتطلب تنمية بكتيريا حامض البروبيونيك توفير متطلبات نمو معقدة حيث أن إضافة الأحماض الأمينية الوسط الغذائي يعتبر مفيداً إلا انه ليس أساسياً لنموها، إلا أن إضافة بعض الفيتامينات مثل حامض البنتوثونيك Pantothonic acid والمعادن وبعض مكونات مستخلص الخمائر تعتبر ضرورية لعمليات النمو والأيض. وتستطيع هذه البكتيريا إنتاج حامض البروبيونيك من خلال استخدام حامض اللاكتيك كما في المعادلة العامة التالية:

$$3\ \text{Lactate} \longrightarrow 2\ \text{Propionate} + \text{Acetate} + CO_2 + H_2O$$

وهذا ما يوضحه الشكل التالي:



الشكل رقم (218) يوضح تكون حامض البروبيونيك من اللاكتات بواسطة بكتيريا حامض البروبيونيك.

إنتاج الأسيتالدهيد Acetaldehyde:

تنتج بكتيريا البادئ الأسيتالدهيد بكميات صغيرة تصل في حدودها القصوى إلى 20 ميكروجرام/مل، ويعتبر الأسيتالدهيد في العادة ناتج من أيض الكربوهيدرات وخصوصاً في البادئات المحبة لدرجة الحرارة العالية Thermophilic Cultures التي يكون إنتاج الأسيتالدهيد فيها بنسب أكبر من تلك المنتجة من قبل البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Cultures، أما في جنس *Lactococcus* والذي ينتمي إلى البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة فإنه يتم إنتاجه من الحامض الأميني ثريونين Threonine من خلال نشاط إنزيم Threonine aldolase وذلك كما يتضح من المعادلة التالية:

$$\text{Threonine} \xrightarrow{\text{Threonine aldolase}} \text{Acetaldehyde} + \text{Glycine}$$

ويعتقد أن الوظيفة الحقيقية لهذه العملية هي توفير الحامض الأميني جليسين Glycine لنمو جنس *Lactococcus*، وقد لوحظ أن أحد سلالات الـ *Lactococcus* التي تحتاج إلى إضافة الحامض الأميني جليسين إلى وسط النمو تفتقر لوجود إنزيم Threonine aldolase. ونتيجة غياب إنزيم Alcohol dehydrogenase في بكتيريا البادئ يؤدي إلى إفراز الأسيتالدهيد من داخل خلايا بكتيريا البادئ، والأسيتالدهيد له أهمية خاصة في نكهة الزبادي، لكنه قد يسبب نكهة غير مرغوباً فيها لمنتجات الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة، وخاصة إذا انخفضت النسبة بين ثنائي الاستيل Diacetyl، والأسيتالدهيد Acetaldehyde إلى 3 : 1، حيث أن النسبة المثالية يجب أن تكون 4 : 1. إن أحد المهام لجنس *Leuconostoc* من خلال علاقة التكافل Synergism في البادئ الخليط هي اختزل الأسيتالدهيد المنتج من جنس *Lactococcus* إلى إيثانول.

تخمرات عائلة *Enterobacteriaceae*:

يؤدي نمو الأجناس التابعة لهذه العائلة في الحليب ومنتجاته إلى إعطاء نكهات وطعوم غير مرغوبة وغازات كما تتسبب في حدوث مشكلة تكون الغاز المبكر في الجبن الملوث بها، ويمكن تقسيم تخمرات البكتيريا التابع لهذه العائلة إلى:

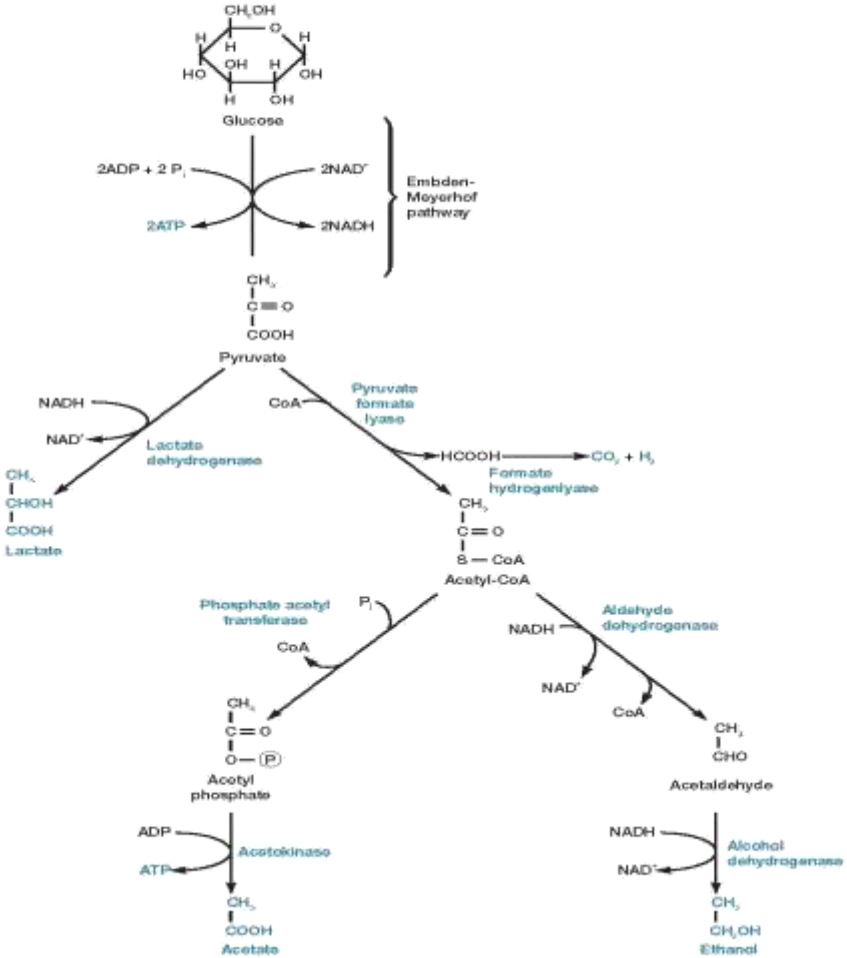
1- البكتيريا المنتجة لخليط الأحماض ومثال عليها بكتيريا *Escherichia coli*.
2- البكتيريا المنتجة للبيوتانديول ومثال عليها بكتيريا *Enterobacter aerogenes*.
3- البكتيريا المنتجة للجليكول ثلاثي الميثيلين ومثال عليها *Citrobacter freundii*.

إن مسارات هدم الكربوهيدرات في البكتيريا التابع لهذه العائلة تتم غالباً بواسطة مسار السكر السداسي ثنائي الفوسفات HDP ومسار السكر السداسي أُحادي الفوسفات HMP، وقد ثبت أن البكتيريا التابع لهذه العائلة تمتلك الإنزيمات الخاصة بهاتين الدورتين ولكن بأشكال متفاوتة مما يؤدي إلى اختلاف أشكال التخمر وبالتالي اختلاف النواتج النهائية لها.

1- تخمرات البكتيريا المنتجة لخليط الأحماض Mixed Acids Producer:

إن بكتيريا *E. coli* تخمر العديد من اللاكتوز مع إنتاج حامض وغاز ويؤدي نموها في الحليب ومنتجاته إلى إعطاء نكهات وطعوم غير مرغوبة وغازات كما تتسبب في حدوث مشكلة تكون الغاز المبكر في الجبن الملوث بها.

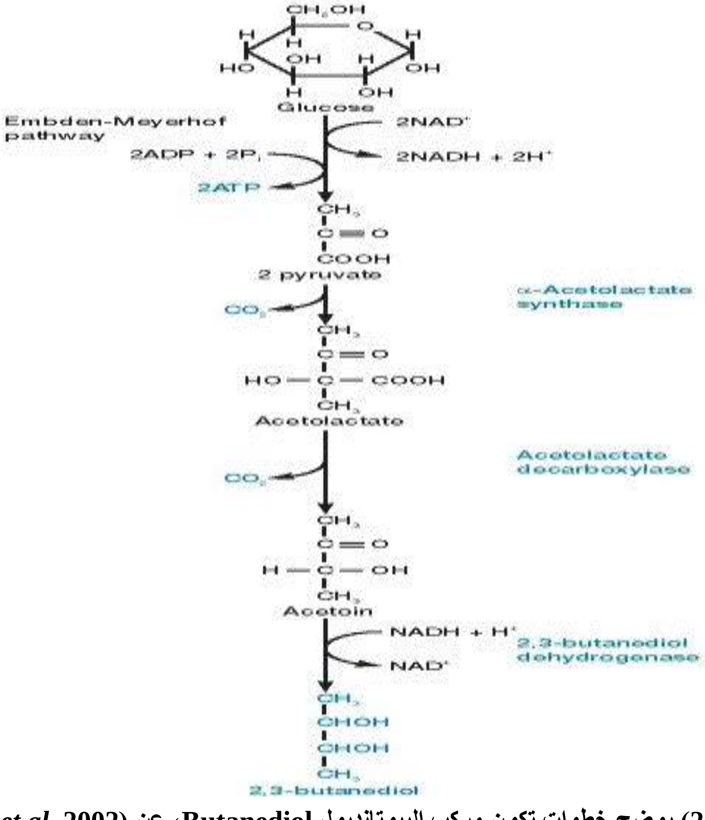
تكون المنتجات النهائية لتخمر بكتيريا *E. coli* عادة متغيره كميا وتتأثر بالرقم الهيدروجيني pH في وسط التخمر، مع إن تغير الرقم الهيدروجيني pH لا يؤثر في نسبة الكحول المنتجة وعند رفع الـ pH فان حامض اللاكتيك يتضاءل بينما يزداد إنتاج كل من حامض الخليك و حامض الفورميك الذي يعتبر إنتاجه من خصائص بكتيريا *E . coli* ويعتقد أن الهيدروجين يتولد من حامض الفورميك مع أن بعض بكتيريا *E . coli* تنتج حامض الفورميك دون أن تنتج الهيدروجين. الشكل التالي يوضح خطوات تخمرات البكتيريا المنتجة لخليط الأحماض.



الشكل رقم (219) يوضح خطوات تخمرات البكتيريا المنتجة لخليط الأحماض، عن (Prescott, *et al.* 2002).

2- تخمرات البكتيريا المنتجة للبيوتانديول Butanediol:

من البكتيريا المنتجة للبيوتانديول Butanediol تلك التابعة لجنس *Enterobacter* الذي يختلف عن جنس *Escherichia* الذي ينتج الهيدروجين H_2 وثاني أُكسيد الكربون CO_2 عند التخمر بنسب متساوية، في حين أن جنس *Enterobacter* ينتج ثاني أُكسيد الكربون CO_2 بكمية أكبر من الهيدروجين H_2 بمقدار خمس إلى ثمان مرات إضافة إلى أن هذا الجنس يختلف عن جنس *Escherichia* بإنتاجه للأسيتون Acetoin الذي يتكون منه البيوتانديول Butanediol عن طريق اختزل الأسيتوين بواسطة إنزيم Butanediol dehydrogenase (EC 1.1.1.4)، كما أن مركب ثنائي الاستيل Diacetyl أيضاً يتكون من الأسيتوين، والشكل التالي يوضح خطوات تكون مركب البيوتانديول.



الشكل رقم (220) يوضح خطوات تكون مركب البيوتانديول Butanediol، عن (Prescott, *et al.* 2002).

3- تخمرات البكتيريا المنتجة للجليكول ثلاثي الميثيلين:

تستطيع بعض أنواع عائلة *Enterobacteriaceae* مثل *Citrobacter freundii* و *Enterobacter aerogenes* تحويل الجليسرول إلى جليكول ثلاثي الميثيلين ولكن هذه العملية غير مرتبطة بمسارات تحول الكربوهيدرات ولكن تلاحظ في وجود الجليسرول.

البادئات Starter Cultures:

يُعرف البادئ في مجال صناعة الألبان بأنه مزرعة نقية نشطة من الأحياء المجهرية المفيدة تُنمى في الحليب أو الشرش ولها القدرة على إعطاء خواص ومميزات محددة لمختلف منتجات الحليب، وقد يتكون البادئ من سلالة واحدة من الأحياء المجهرية ويدعى عندئذ بالبادئ الأحادي أو من أكثر من سلالة أو أكثر من نوع وعندئذ يسمى البادئ الخليط. وهنالك العديد من البادئات المستعملة في صناعة الألبان المتخمرة والجبن ويزيد عددها عن 40 نوع تختلف فيما بينها من حيث صفاتها المورفولوجية وكذلك مقدرتها على إنتاج الحامض أو مركبات النكهة التي تميز المنتج اللبني المتخمر.

ويتلخص دور البادئ في صناعة الألبان المختمرة بما يلي:

أولاً : إنتاج حامض اللاكتيك نتيجة لتخمير سكر اللاكتوز، مما يعطي الطعم الحمضي (الحموضة) المميز للألبان المتخمرة خلال تصنيعها، أما في صناعة الجبن فإن إنتاج حامض اللاكتيك يعد ضروريا لتكون الخثرة وبالتالي تكون قوام الجبن .

ثانياً : إنتاج مركبات مثل ثنائي الاستيل Diacetyl، والاسيتالدهيد Acetaldehyde والتي تسهم في تكون نكهة المنتجات اللبنية.

ثالثاً : تحتوي ميكروبات البادئ على إنزيمات محللة للبروتين وإنزيمات محللة للدهون، وهذه الإنزيمات ضرورية في عملية تسوية بعض أنواع الجبن.

رابعاً : بعض أنواع البادئات تنتج مركبات أُخرى مثل الكحول الذي يعد أساسياً في صناعة منتجات لبنية متخمرة مثل الكيفير والكوميس.

خامساً : تكون البادئات ظروف حامضية وبعضها يفرز مركبات مثبطة لبعض الميكروبات الأُخرى مما يمنع نمو الأحياء المجهرية المرضية أو المسببة لفساد تلك المنتجات.

إن سلالات وأنواع الأحياء المجهرية الداخلة في صناعة مختلف أنواع البادئات المعروفة تم عزلها أساساً من الألبان المتخمرة التي كانت تنتج بشكل بدائي ومتوارث، ومعظم الأحياء المجهرية الشائعة الاستخدام في بادئات الألبان المختمرة تضم غالبا بكتيريا حامض اللاكتيك وتضاف إليها بعض الأنواع الأخرى من البكتيريا والخمائر أو الأعفان لإنتاج الجبن والألبان المختمرة المطلوبة.

وتنتخب سلالات البادئات حسب قابليتها للنمو وإنتاج حامض اللاكتيك وقابليتها لإنتاج مركبات النكهة وإنتاج ثاني أكسيد الكربون CO_2 ومقاومتها للغزو من قبل البكتيريوفاج Bacteriophage وكذلك مقدار قابليتها لإعطاء اللزوجة لبعض منتجات الألبان المتخمرة، ويتم اختيار السلالات المناسبة في كل حالة لإنتاج بادئ خاص لصناعة منتج لبني مميز. فمثلا حليب الخض المتخمر وجبن الكوتج Cottage يحتاجان إلى بادئ نشط وذو قدرة على إنتاج حامض اللاكتيك بسرعة وكذلك إعطاء نكهة جيدة. بينما في صناعة جبن التشدرCheddar يستعمل

بشكل رئيسي بادئ ذو قدرة على إنتاج الحامض سريع. أما البادئ المفضل في صناعة القشدة الحامضية فهو البادئ ذو القدرة على إنتاج الحامض بسرعة عالية وإضفاء نكهة جيدة وإعطاء لزوجة عالية للمنتج. وكما أشرت سابقاً أن بادئات الجبن والألبان المختمرة تضم غالبا بكتيريا حامض اللاكتيك وتضاف إليها بعض الأنواع الأخرى من البكتيريا والخمائر أو الأعفان، وتشمل هذه البادئات ما يلي:

<u>أولاً</u>: بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك وتشمل:

1- البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة Mesophilic Cultures:

وتشمل بكتيريا حامض اللاكتيك التي تنمو في درجات حرارة تتراوح بين 10 - 40°م وتكون درجة حرارة نموها المثلى 30°م وتضم جنس *Lactococcus* الذي كان يعرف سابقاً بـ Group N Streptococci كذلك *Leuconostoc* و *Pediococcus* ومن أشهر هذه البادئات:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* وينتج حامض اللاكتيك.
- *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* وينتج حامض اللاكتيك و Diacetyl.
- *L. lactis* subsp. *cremoris* وينتج بشكل أساسي حامض اللاكتيك.
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ينتج لاكتيك و Diacetyl.
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ينتج حامض اللاكتيك و Diacetyl.
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ينتج لاكتيك و Diacetyl.
- *Pediococcus acidilactic* وينتج بشكل أساسي حامض اللاكتيك.

وتستخدم البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة بكثرة في إنتاج العديد من أصناف الجبن وبعض الألبان المتخمرة التي تنتج بكثرة في الدول الاسكندينافية تحت أسماء مختلفة، وتعطي هذه البادئات للمنتج اللبني المتخمر قوام ونكهة مميزين نتيجة لقدرتها على إنتاج الحموضة وإنتاج مركبات النكهة من تخمر سكر اللاكتوز وحامض الستريك.

2- البادئات المحبة لدرجة الحرارة العالية Thermophilic Cultures:

وتشمل بكتيريا حامض اللاكتيك التي تنمو في درجات حرارة تتراوح بين 40 - 45°م وتشمل أجناس *Streptococcus* و *Lactobacillus* ومن أمثلة أنواع هذه البادئات ما يلي:

- *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ينتج حامض اللاكتيك و Diacetyl و Acetaldehyde.
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* وينتج حامض اللاكتيك.
- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ينتج حامض اللاكتيك و Acetaldehyde
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* وينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus ferrnentum* وينتج حامض اللاكتيك.

- *Lactobacillus helveticus* وينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus kefir* وينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus kefiranofaciens* وينتج حامض اللاكتيك.

وتستخدم البادئات المحبة لدرجة الحرارة العالية في إنتاج العديد من الألبان المتخمرة مثل الزبادي والحليب الخض المتخمر وغيرها من المشروبات اللبنية المتخمرة.

3- البادئات الصحية أو العلاجية Therapeutic Cultures:

وتضم هذه البادئات بكتيريا التي لها دور ايجابي في إعادة التوازن الطبيعي للميكروبات المعوية وتسمى هذه البكتيريا بالبكتيريا الداعمة للحيوية Probiotic bacteria، وهذه البكتيريا لها شروط ومواصفات خاصة بحيث تستطيع أن تبقى حية ونشطة خلال مرورها عبر القناة الهضمية حتى تصل إلى الأمعاء وتستوطنها، ومن أهم هذه الشروط ما يلي:

1- قدرتها على المرور خلال المعدة والجزء العلوي من الأمعاء وذلك بفضل مقاومتها لحموضة المعدة وتحملها لأملاح الصفراء Bile salt.

2- استقرارها في أمعاء الانسان من خلال قدرتها على الالتصاق بقوة بالخلايا المبطنة للأمعاء.

3- إنتاجها لمواد مضادة للميكروبات Antimicrobial substances تعمل على تثبيط البكتيريا الضارة وتحسينها للمناعة المعوية Intestinal immunity.

4- خفض مستويات المركبات الأيضية البكتيرية المعوية المشاركة في سرطان القولون من خلال تثبيطها لتلك البكتيريا الضارة، وكذلك قدرتها على تكسير وتثبيط المركبات المسرطنة في الأمعاء وتحفيز الجهاز المناعي وتحسين المناعة المعوية، كذلك قدرتها على تغيير الظروف الفيزيوكيميائية في القولون وبالتالي خفض فرصة تكوين المواد المسرطنة.

وهذه البكتيريا تشمل *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* ومن أشهر أنواع هذه البادئات:

- *Lactobacillus acidophilus* الذي ينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* وينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* biovar. *shirota* وينتج لاكتيك.
- *Lactobacillus rhamnosus* الذي ينتج حامض اللاكتيك.
- *Lactobacillus reuteri* الذي ينتج كل من حامض اللاكتيك و CO_2.
- *Bifidobacterium adolescentis* وينتج حامض اللاكتيك و Acetate.
- *Bifidobacterium bifidum* وينتج حامض اللاكتيك و Acetate.
- *Bifidobacterium breve* وينتج حامض اللاكتيك و Acetate.
- *Bifidobacterium infantis* وينتج حامض اللاكتيك و Acetate.
- *Bifidobacterium longum* وينتج حامض اللاكتيك و Acetate.

وتستخدم البادئات الصحية أو العلاجية **Therapeutic Cultures** في إنتاج المشروبات اللبنية المتخمرة ذات الخواص الصحية أو العلاجية.

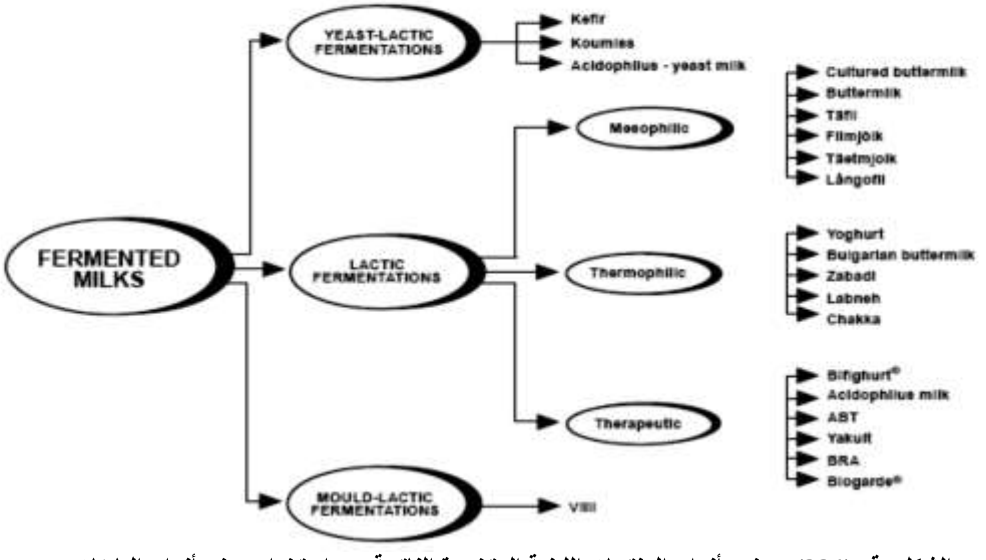
ثانياً: بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والخمائر:

وتحتوي هذه البادئات إضافةً إلى بكتيريا حامض اللاكتيك بعض الخمائر التي تنتج الكحول و ثاني أكسيد الكربون CO_2، ومثال على الألبان المتخمرة المنتجة بهذا النوع من البادئات الكيفير **Kefir** والكوميس **Koumiss** و حليب **Acidophilus yeast**.

ثالثاً: بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والأعفان:

أما البادئات التي تحتوي على بكتيريا حامض اللاكتيك والعفن فمثال عليها منتج يدعى **Viili** وينتج في فنلندا ويستخدم في إنتاجه بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة وعفن ***Geotrichum candidum***.

والشكل التالي يوضح أنواع المنتجات اللبنية المتخمرة الناتجة عن استخدام البادئات المذكورة.



الشكل رقم (221) يوضح أنواع المنتجات اللبنية المتخمرة الناتجة عن استخدام بعض أنواع البادئات، عن (Tamime and Robinson, 1999).

وإضافة إلى أنواع البادئات المذكورة سابقاً هناك أنواع أخرى من البادئات تحتوي على أنواع أُخرى من البكتيريا مثل ***Enterococcus faecium*** المستخدمة في صناعة جبن التشدر المعدل في أميركيا الشمالية و ***Enterococcus spp.*** المستخدمة في إنتاج مشروبات متخمرة ذات خواص صحية و ***Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii***

المستخدمة في صناعة الجبن السويسري وخمائر مثل *Saccharomyces cerevisia* و *Saccharomyces exiguus* و *Saccharomyces unisporu* و *Candida kefyr* و *Kluyveromyces marxianus* التي تستخدم في صناعة المشروبات اللبنية المتخمرة الحاوية على الكحول و CO_2، بالإضافة إلى بعض الأعفان مثل *Penicillium roqueforti* و *Penicillium camemberti* و *Penicillium caseicola* التي تستخدم جميعها كبادئات في صناعة أصناف مختلفة من الجبن.

وتوجد البادئات المستخدمة لإنتاج الجبن الألبان المختمرة بعدة أشكال تجارية، يتوقف نجاح استخدامها على معرفة الظروف المثلى لتنمية تلك المزارع والعوامل التي تتحكم فيها، فالبادئات هي أكثر العوامل أهمية في تحديد خواص وجودة المنتجات اللبنية المختمرة.

وتتوافر البادئات على ثلاث أشكال تجارية يمكن استخدامها وهي البادئات السائلة والبادئات المجمدة والبادئات المجفدة **Liquid, Frozen and Freeze-Dried starter culture**.

ولاستخدام البادئات المجمدة والمجفدة مزايا متعددة أهمها:

1- سهولة استخدامها وخاصة في المصانع الكبيرة.

2- ذات نشاط عالي جداً.

3- سهولة المحافظة على جودتها.

4- تحتاج إلى عماله فنية مدربة أقل

5- يمكن السيطرة على التلوث بالبكتريوفاج **Bacteriophage** بدرجة كبيرة.

غير أن استخدام البادئات المجمدة والمجفدة يواجه عدة صعوبات يمكن تلخيصها بالتالي:

1- عملية نقل البادئات تحتاج إلى عناية قد يصعب توفيرها وبالتالي تفقد البادئات من نشاطها.

2- تحتاج هذه البادئات إلى ظروف خاصة في التخزين وإلا تعرضت لفقد نشاطها.

3- أن منتج المزارع البكتيرية هو الذي يحدد جودة المنتج النهائي بدرجة كبيرة وليس المصنع لذا ينبغي الحصول على هذه البادئات من منتجين موثوق في جودة سلالاتهم.

وبالرغم من ذلك فإن المزايا المتعددة للبادئات المركزة (المجمدة والمجفدة) جعلت صناعة الألبان تتجه إلى استخدامها بصورة متزايدة في السنوات الأخيرة.

البادئات السائلة Liquid starter culture:

يحصل المُصنع على البادئ من المُنتج على الصورة السائلة حيث يقوم بتنشيطه من خلال عملية إعادة الزرع مرتين أو ثلاث مرات إلى أن يحصل على المزرعة الأم **Mother culture**، وهنا يتضح أن تداول البادئات السائلة مكلف ويحتاج إلى جهد وعمالة كبيرة ومدربه لتداول

الصور السائلة من البادئات في المصانع فضلاً عن الحاجة إلى تجهيزات خاصة، وقد يحدث تلوث لمزارع البادئات بأنواع غير مرغوبة من البكتيريا أثناء عمليات إعادة الزرع أو يحدث تلوث بالبكتريوفاج. وبالرغم من تلك الصعوبات فان نظام البادئات السائلة يوفر للصانع القدرة على تكوين بادئات خاصة بمنتجاته، وأيضا تصنيع بعض المنتجات التي لا يوجد لها بادئات مركزة.

ويمكن استخدام نظام البادئات السائلة مع البادئات المجفدة حيث تستخدم لتحضير المزرعة الأم **Mother culture** للبادئات السائلة. والبادئات المجفدة يمكن الحفاظ على نشاطها لمدة تصل إلى 6 أشهر إذا حفظت في درجة حرارة -25°م ولمدة 3 أشهر إذا ما خزّنت على -6°م وعلى ذلك يمكن للمصنع شراء كميه من البادئات المجفدة لاستخدامها على فترات.

ويفضل استخدام البادئات المجفدة وحيدة السلالة، حيث أنه في حالة استعمال مزارع خليطه فان عملية التجفيد قد تؤدى إلى اختلال التوازن بين الكائنات المختلفة وخاصة إذا ما كان البادئ يحتوى على خمائر أو أعفان، ويمكن التغلب على ذلك باستخدام درجات حرارة تحضين فيما بعد تساعد على إعادة الاتزان بين الكائنات المختلفة الموجودة في البادئ، أو باستخدام بادئات وحيده مجفدة بصورة مفصلة ثم إعادة خلطها بالنسب المطلوبة عند الاستخدام.

البادئات المجمدة Frozen starter culture:

يستخدم المصنع البادئات المجمدة كمزرعة أم **Mother culture** مباشرة دون الحاجة إلى تحضين مبدئي. وفى هذا النوع من البادئات فان المنتج يقوم بتنظيم خطوات التحضير وبذلك يكون العمل في المصنع أكثر سهولة من الصورة السائلة إلا أن ذلك يجعل المصنع تابع لمصدر خارجي للحصول على بادئاته.

إن خطوة تجميد الخلايا عند إنتاج البادئات المجمدة تعتبر من أكثر الخطوات الحساسة إذ أنها تحدد مدى الحفاظ على نشاط البادئ إلى حد كبير بعد التجميد. وعند التجميد تعلق الخلايا في وسط يحميها من التأثير المدمر للتجميد وغالبا باستخدام المواد الصلبة للحليب واللاكتوز وحامض الجلوتاميك كمواد واقية للخلايا البكتيرية من أثر التبريد، وعادة ما يفضل تجميد الخلايا باستخدام النيتروجين السائل والذي يتسبب في أقل قدر من التأثير المدمر على معظم الخلايا البكتيرية ويمكن حفظ البادئات المجمدة عند درجة حرارة -196°م (في النيتروجين السائل) لمدة تصل إلى 6 أشهر دون فقدانها لخواصها ونشاطها. وفي المصانع يفضل حفظ البادئات المجمدة في النتروجين السائل ولكن يمكن استخدام مجمدات عند درجة حرارة -40°م حيث تحتفظ فيها البادئات المجمدة بنشاطها لعدة أشهر.

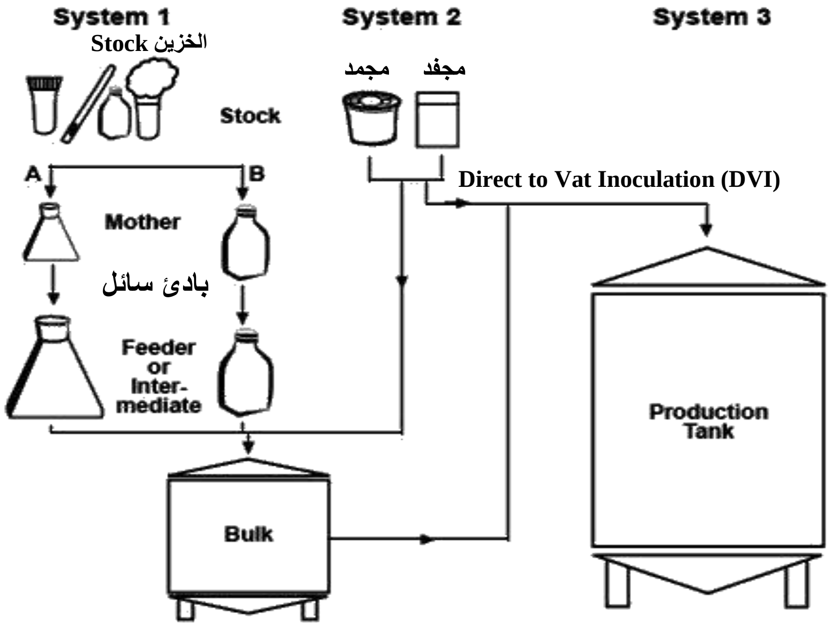
البادئات المجفدة Freeze-Dried starter culture:

وهى أحدث الصور التجارية للبادئات حيث تحضر بنفس الأسلوب الذي يتم به تحضير البادئات المجمدة ثم تجفد بعد ذلك. وعلى ذلك فهي تعتبر أفضل وأسهل طريقة في نقل واستخدام البادئات المركزة مقارنة بالبادئات المجمدة، أن عدد الخلايا البكتيرية للبادئ في صورته المجفدة يصل إلى 10^{11}/جم بينما العدد الكلي للبادئ المجمد لا يتجاوز 10^{10}/جم ولذلك تكفى عبوة البادئ المجفد لتلقيح كميات كبيرة جداً من الحليب مباشرة في خزانات الإنتاج Direct to Vat Inoculation (DVI)، وأهم مزايا الصورة المجفدة هو إمكانية حفظها على درجة الثلاجة ويفضل حفظها في درجة حرارة -20°م للحفاظ على قوتها مدة طويلة تصل إلى 5 أشهر، وباستخدام هذه الصورة أمكن التغلب على صعوبة النقل والشحن من المنتج دون المخاطرة بنشاط البادئ ودون الحاجة إلى وسائل حفظ معقدة.

الأشكال التالية توضح صور وأنظمة مختلفة للبادئات التجارية تستخدم في إنتاج الألبان المتخمرة.

(A) بادئ سائل،(B) بادئ محفوظ في حليب عباد الشمس litmus milk، (C، D، E) بوادئ مجمّدَة في درجة حرارة -30°م، (F) بادئ مجمد مركز في عبوة خاصة، (G) بادئ مجمّدَ في النتروجينِ السائلِ في أنبوبة من البولي إثلين، (H) بادئ مجمّدَ في النتروجينِ السائلِ في عبوه سهلة الفتح، (I) بادئ مجفد، (J) بادئ مجفد مركز.

الشكل رقم (222) يوضح الصور المختلفة للبادئات التجارية المستخدمة في إنتاج الألبان المتخمرة، عن (Tamime and Robinson, 1999).



الشكل رقم (223) يوضح الأنظمة المختلفة للبادئات التجارية المستخدمة في إنتاج الألبان المتخمرة، عن (Tamime and Robinson, 1999).

وبالرغم من انتشار استخدام البادئات المجفدة المركزة حيث يتم تلقيح الحليب مباشرة في خزانات الإنتاج Direct to Vat Inoculation، نظراً لما تتمتع به هذه الطريقة من سهولة ومزايا جعلت الكثير من منتجي الألبان المتخمرة يلجئون إليها، إلا أن الطريقة التقليدية المتبعة في التعامل مع البادئات السائلة والمجمدة لازال معمول بها في العديد من مصانع الألبان على مستوى العالم (مع الإشارة إلى أن استخدام البادئات المجفدة المركزة بدأ يحل محلها بشكل ملحوظ).

وتعتمد الطرق المتبعة في التعامل مع البادئات السائلة أو المجمدة على وضع برنامج خاص للعناية بالبادئات وأقسام خاصة لها ويتطلب هذا البرنامج توفير مواد خام جيدة ودرجة عالية من النظافة والتطهير ومعاملة حرارية ودرجات حرارة تحضين ثابتة وموحدة. ويمكن استعمال بادئ معين لفترة طويلة من الوقت وذلك بإتباع برنامج خاص في المحافظة عليه من التلوث وإجراء عملية النقل بصورة دورية مع التحضين على حرارة ثابتة، وقد لا يستطيع بعض المصنعين المحافظة على البادئ مدة طويلة من الوقت، والعادة الجارية في الوقت الحاضر هي استعمال بادئ مجفد جديد مرة كل ثلاثة أو أربعة أسابيع إلا أنه من المفضل المحافظة على البادئ الجيد الخواص وذلك لعدم في ضمان الحصول على هذه الصفات عند استبداله ببادئ جديد، كما أن البادئ الجديد يحتاج إلى وقت كافي لمعرفة خواصه.

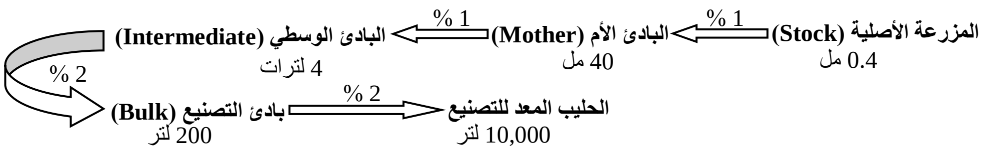
عند اختبار سلالات جديدة من البادئ يتم تلقيح ثلاث مكررات من الحليب لكل سلالة من هذه السلالات المختلفة للحصول على بادئ خاص يتم اختياره للاستعمال في إنتاج البادئ المستخدم في الإنتاج. يتم اختيار أفضل السلالات من حيث خواص البادئ الناتج ثم تفحص المكررات الثلاثة له ويستعمل أفضلها، ثم تكرر عملية إعادة زرع هذا البادئ بنفس الطريقة يوميا، وفي حال تلفت إحدى هذه المكررات يكون بالإمكان استعمال الثانية أو الثالثة. يجب أن يتوفر المكان المناسب لتنشيط البادئ والمحافظة عليه في مكان نظيف وخالي من الغبار ومزودا بما يتطلبه العمل من خدمات مثل جهاز لتعقيم الحليب وقناني خاصة تستعمل في نقل وتنشيط البادئ بأحجام مناسبة، وفي حالة استعمال البادئ المركز المجمد والمجفد تظهر الحاجة إلى توفير حمام مائي مناسب ومجمدة لحفظ البادئ لحين الاستعمال.

وتقوم معظم معامل الألبان بشراء سلالات البادئات من المختبرات أو الشركات التجارية المجهزة لها والتي لها الشهرة في إنتاج البادئات الجيدة والمعروفة بقدرتها على مقاومة البكتيروفاج وكذلك مقاومة البعض منها للمضادات الحيوية، إضافةً إلى خواصها الإنتاجية الجيدة. هذه السلالات تعرف بالمزرعة الأصلية أو الخزين Stock الذي يستخدم في تحضير البادئ الأم Mother starter culture الذي يعرف بأنه مزرعة ميكروبية صغيرة الحجم من إحدى السلالات الميكروبية التي تُنمى في الحليب أو الشرش، ينقل يوميا في ثلاث عبوات بحيث تُختار أفضل عبوة لاستعمالها في التلقيح لإنتاج البادئ الوسطي أو التصنيعي Feeder or bulk starter culture. وعند تحضير البادئ الأم يجب أن يكون المسئول عن تحضير البادئات ملماً الماما كافيا بالطرق التكنولوجية المستعملة في عملية نقل البادئ بكل حذر وعناية فائقة يتطلبها هذا العمل. ويعرف البادئ التصنيعي Bulk starter culture، بأنه البادئ الذي يستعمل في تصنيع المنتجات المتخمرة ويختلف حجمه اليومي حسب الطاقة الإنتاجية للمصنع.

يفضل بعض المشتغلين في صناعة الألبان تنمية وتنشط السلالات بصورة منفردة وعندما ير غب في استعمالها تجمع مع السلالات الأُخرى المناسبة عند إضافتها للحليب، بينما يفضل آخرين استعمال البادئ الخليط وذلك لضمان عملية التخمر عند مهاجمة البكتيريوفاج لأحد السلالات في البادئ حيث تبقى السلالة الأُخرى نشطة تستمر في عملية التخمر وفي إنتاج الحموضة المناسبة. وغالبا ما تتوفر علاقة تآلفية بين البكتيريا المنتجة للحامض والبكتيريا المنتجة للنكهة في البادئات المختلطة. كما قد تظهر علاقة تضاد أو تزاحم وذلك بسيادة إحدى السلالات على الأُخرى. ولتقليل احتمال ظهور هذه المشاكل يجب توحيد ظروف الإنتاج كتوحيد درجة حرارة التحضين ونسبة الحموضة النهائية المثلى وتكرار عملية النقل الدورية. وغالبا ما يستعمل الحليب كوسط لتحضير بادئ التصنيع كما تستعمل أوساط أُخرى خاصة لإنتاج مثل هذا

البادئ سواء كان لخصوصيتها في إعطاء المقاومة لبكتيريا البادئ تجاه غزو البكتيريوفاج أو لرخص ثمنها وقد تضاف بعض المواد المنشطة لنمو البكتيريا إلى أوساط التحضير تلك.

يعتبر تحضير بادئ التصنيع Bulk starter culture من أهم الخطوات لإنتاج الألبان المختمرة فمازالت هذه الخطوة المتبعة في معظم خطوط الإنتاج بالرغم من إمكان استبدالها بالبادئات المركزة وتلقيحها مباشرة في الحليب المعد لصناعة المنتجات المتخمرة. ويمكن تقسيم عملية تحضير بادئ التصنيع Bulk starter culture إلى خطوات متتابعة ولكن مع الأخذ في الاعتبار أننا نتعامل مع عملية واحدة وأن أي خطا في أي خطوة من هذه الخطوات سيؤثر سلبا في البادئ ككل وفى نجاح تصنيع المنتج. وكما أشرت سابقاً أن الحليب يعتبر البيئة التقليدية لتنمية وتحضير بادئ التصنيع Bulk starter culture وقد تستخدم بيئات خاصة تحتوى على الفوسفات لمنع نشاط البكتيريوفاج وخصوصاً في صناعة الجبن حيث يعمل الفوسفات على الارتباط بأيونات الكالسيوم اللازمة لمهاجمة البكتيريوفاج للبكتيريا غير أن هذه البيئات لا تستخدم في تحضير بيئات بادئ التصنيع لصناعة الألبان المختمرة حتى لا تنتقل المواد المضافة إلى المنتج. وتنحصر خطوات إعداد بادئ التصنيع في عدة خطوات تبعا لصورة البادئ المستخدم، والمخطط التالي يوضح الخطوات المتبعة لتحضير بادئ تصنيع يكفي لتلقيح 10,000 لتر من الحليب المعد لتصنيع الجبن أو الألبان المتخمرة باستخدام معدل تلقيح 2 %.



ويتم إعداد بادئ التصنيع Bulk starter culture الكبير الحجم بإحدى طريقتين هما:

1- <u>استخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية</u>:

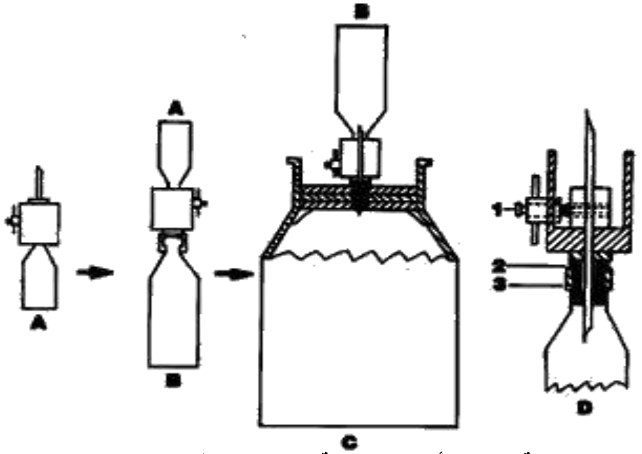
وهذه الطرق التقليدية تستخدم أنابيب اختبار ودوارق (سعة 150 مل) لإعداد مزرعة البادئ الأم Mother starter culture ودوارق أكبر(سعة 2 - 5 لترات) لإعداد مزرعة البادئ المغذي أو الوسطي Feeder or Intermediate starter culture، ولا يحتاج هذا إنتاج البادئ إلا إلى حوض ذي تصميم بسيط يضم نظام للتسخين من أجل بسترة الحليب بطريقة LTLT وأيضاً لتوفير درجة الحرارة المناسبة لتحضين للبادئ، وتتم عملية نقل البادئ من مزرعة البادئ المغذي أو الوسطي إلى حوض بادئ التصنيع Bulk starter culture بفتح غطاء الحوض وصب محتويات دوارق التلقيح في الحليب المعد لإنتاج البادئ من ثم إجراء عملية التقليب. وهذه الطرق تصلح للاستخدام في حالة الإنتاج الصغير وفى المصانع متعددة الأغراض.

2- استخدام الأنظمة المحمية ميكانيكياً Mechanically protected systems:

وهناك عدة أنظمة ميكانيكية لإجراء عملية تنمية للبادئ ونقله خلال مراحل إعداده وأهم ما يميز هذه الطرق أن تسخين وتبريد وتحضين البيئة المستخدمة لتنمية البادئ تتم في أحواض مغلقة، وأن عملية التلقيح تتم من خلال حاجز يمنع دخول الهواء أثناء عملية التلقيح، وتستخدم هذه الطرق في حالة الإنتاج الكبير للألبان المختمرة والتي تحتاج إلى مزارع بادئ كبيرة الحجم للاستخدام في أحواض التصنيع. ومن أشهر هذه الأنظمة نظام لويس Lewis system الذي يعتمد على أساس استخدام قنينات من البولي إثلين التي يمكن استخدامها باستمرار وهي عادة ما تكون بسعة 115 جرام لمزرعة البادئ الأم و 850 جرام لمزرعة البادئ الوسطي.

يعتمد في نظام لويس عند نقل البادئ من وعاء لآخر على ضغط قارورة البولي إثلين لضخ مزرعة البادئ. وتنقل مزرعة البادئ باستخدام إبرة معدة للحقن ثنائية الفتحات، والشكل التالي يوضح الهيكل العام للطريقة. يتطلب نظام لويس خزان تحت ضغط لبادئ الإضافة (التصنيع) حيث تعامل بيئة النمو بالحرارة في داخل الوعاء المحكم الغلق. والنقطة الجديرة بالملاحظة هنا هو التأكد من عدم دخول الهواء خلال تسخين أو تبريد الحليب أو خروجه. يغطى سطح الخزان بمحلول هيبوكلورايت الصوديوم (100 مجم/لتر) حتى يتم نقل بادئ التلقيح من مزرعة البادئ الوسطي إلى بيئة بادئ التصنيع خلال حاجز معقم. وهناك أنظمة محمية ميكانيكياً أُخرى غير نظام لويس Lewis system، مثل نظام تترباك Tetra Pak system ونـظام ألفا-لافال Laval system α ونظام جونز Jones system وغيرها من الأنظمة المختلفة المستخدمة في نقل بادئ التلقيح حتى يصل إلى بيئة بادئ الإضافة (التصنيع) بدون تلوث.

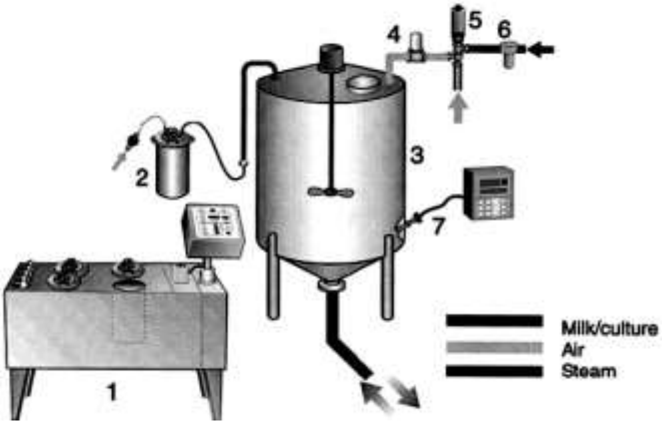
والشكل التالي يوضح رسم تخطيطي لنظام لويس Lewis system لنقل مزرعة البادئ.



(A) مزرعة البادئ الأم (B) مزرعة البادئ الوسطي (C) بادئ التصنيع
(D) تركيب تفصيلي للإبرة: (1) صنبور (2) لحام معدني (3) محلول هيبوكلورايت الصوديوم

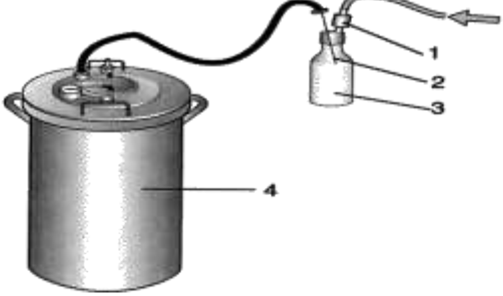
الشكل رقم (224) رسم تخطيطي لنظام لويس Lewis، عن (Tamime and Robinson, 1999).

الشكل رقم (225) يوضح نقل بادئ التلقيح من مزرعة البادئ الوسطي إلى بيئة بادئ الإضافة (التصنيع) خلال حاجز معقم من محلول هيبوكلورايت الصوديوم (100 مجم/لتر)، عن (Tamime and Robinson, 1999).



(1) حاضنة البادئ الأم وتعرف باسم (Viscubator)، (2) حاوية البادئ المُغذي أو الوسطي، (3) خزان بادئ التصنيع، (4) مرشحات HEPA، (5) صمام الهواء، (6) مرشح البخار، (7) وحدة قياس الـ pH.

الشكل رقم (226) يوضح نظام تتراباك Tetra Pak system لنقل بادئ التلقيح من مزرعة البادئ الوسطي إلى بيئة بادئ التصنيع، عن (Bylund, 1995).



(1) مرشح معقم، (2) إبرة معقمة، (3) زجاجة البادئ الأم، (4) حاوية البادئ الوسطي من الفولاذ المقاوم للصدأ.

الشكل رقم (227) يوضح نظام تتراباك Tetra Pak system لنقل البادئ الأم إلى مزرعة البادئ الوسطي الموضحة في الشكل رقم (226)، عن (Bylund, 1995).

النشاطات الأيضية المهمة للبادئات:

1- إنتاج حامض اللاكتيك:

للبادئات القدرة على إنتاج حامض اللاكتيك من تخمر سكر اللاكتوز بنسبة تصل إلى 0.1 – 0.2 % في حالة استخدام جنس *Leuconostoc* و تبلغ الحموضة 0.5 – 0.7 % في حالة استخدام جنس *Lactococcus* بالنسبة للبادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة حيث تقف تخمرات هذه البادئات عند أس هيدروجيني *pH* يبلغ حوالي 4.5، حيث أن الحموضة العالية تصبح عامل محدد لنشاط البادئ. أما في حالة البادئات المحبة لدرجة الحرارة العالية فإن لها القدرة على إنتاج نسبة عالية من الحموضة تتراوح بين 1 –2 % أو أكثر. وكما سبقت الإشارة إلى أن هنالك نمطين لتخمر سكر اللاكتوز هما التخمر المتجانس والتخمر المتباين.

2- تحلل البروتين:

تحتاج البادئات إلى الأحماض الأمينية لنموها، لكن الحليب لا يحتوي على الكمية المناسبة من الأحماض الأمينية الحرة اللازمة لهذا النمو، ولذلك نجد أن النشاط الإنزيمي لتحليل البروتينات لهذه الأنواع من البكتيريا قوى فنجد أن جنس *Lactococcus* يحتوى على إنزيمات محللة للبروتين مرتبطة بجدار الخلية لها القدرة على تحليل بروتينات الحليب إلى ببتيدات يمكن أن تنتقل من خلال جدر الخلايا إلى داخلها حيث تقوم الإنزيمات المحللة للببتيدات بتكسيرها إلى الأحماض الأمينية اللازمة لنموها. أما أنواع جنس *Leuconostoc* فلا تمتلك هذه القدرة على تحليل البروتين ولذلك فإنها تنمو ضعيفة إذا ما كانت بمفردها في بيئة التلقيح أما في المزارع المختلطة فتظهر نمواً جيداً. وبكتيريا *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* تمتلك إنزيمات محللة للبروتين بعكس *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* التي لا تمتلك القدرة على تحليل البروتينات وبالتالي فإن وجودهما معاً يُمَكن هذا الأخير من النمو بشكل جيد لأن النوع الأول ينتج أحماض أمينيه و ببتيدات ناتجة عن تحليله لبروتينات الحليب، وهذه المواد في غاية الأهمية لنمو النوع الثاني.

3- تحلل الدهون:

النشاط المتحلل للدهون في البادئات ضعيف بصفة عامة ومعظم الأحماض الطيارة في المنتجات المتخمرة تنتج غالباً من تخمر مكونات أُخرى.

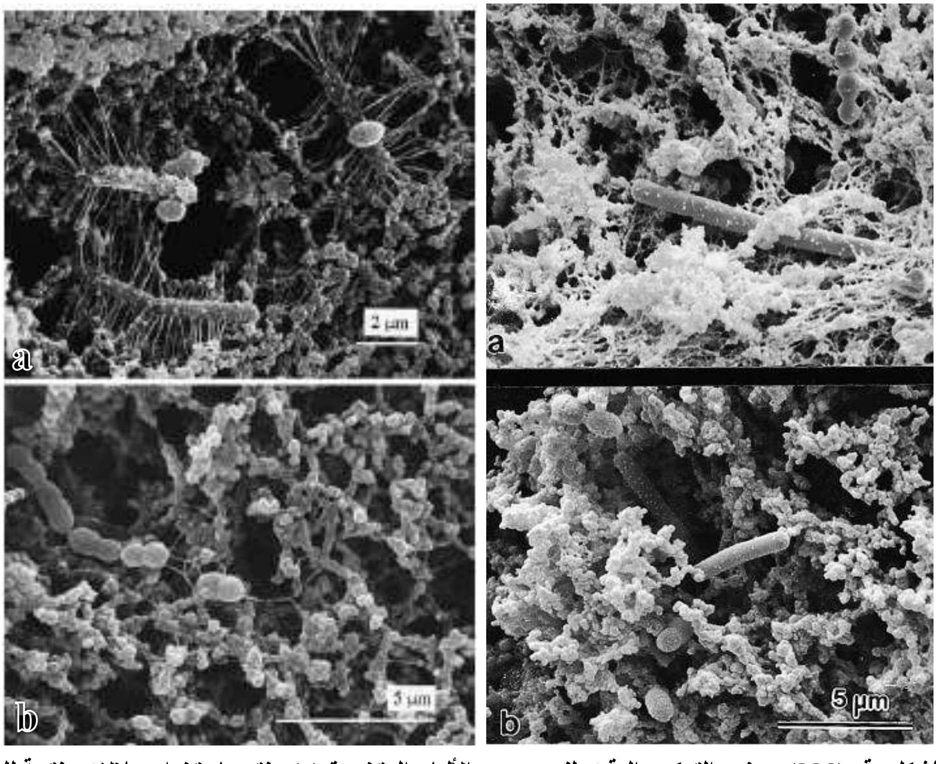
4- تخمر حامض الستريك:

تنتج البكتيريا التابعة لجنس *Leuconostoc*، وأنواع من الجنس *Lactococcus* مركبات الطيارة مثل ثنائي الأستيل Diacetyl وثاني أكسيد الكربون CO_2 من تخمرات حامض

الستريك، مع العلم بأن جز من ثاني أكسيد الكربون CO_2 المتكون ينتج من التخمر المختلط (غير المتجانس) لسكر اللاكتوز بواسطة بعض أنواع بكتيريا البادئ متباينة التخمر.

5- إنتاج المواد المكونة للزوجة في المنتج النهائي:

هناك سلالات من بكتيريا البادئ لها القدرة على إنتاج مواد عديدة السكريات Exopolysaccharide (EPS) والتي تعطي للمنتج خواصه المميزة وخصوصاً في الألبان المتخمرة المنتجة في الدول الاسكندينافية. والشكل التالي يوضح التركيب الدقيق المصور بالمجهر الإلكتروني الماسح لنوعين من الألبان المتخمرة أحدهما منتج باستخدام سلالات منتجة للسكريات المتعددة الخارجية (التي تنتج خارج الخلية EPS) والأخرى غير منتجه لها.



الشكل رقم (228) يوضح التركيب الدقيق لنوعين من الألبان المتخمرة (a) منتج باستخدام سلالات منتجة للـ (EPS) و (b) منتج باستخدام سلالات غير منتجه للـ (EPS)، عن (Tamime and Robinson, 1999).

6- إنتاج المواد المثبطة:

لبكتيريا البادئ القدرة على إنتاج بعض المواد المثبطة لنمو الميكروبات المرضية وتلك المسببة للفساد ومن أهم أمثلة هذه المواد المثبطة حامض اللاكتيك – الأحماض العضوية – فوق أكسيد الهيدروجين والعديد من المركبات الشبيهة بالمضادات الحيوية، التي كان أول ما أُكشف منها النيسين الذي تفرزه بعض سلالات البكتيريا *Lactococcus lactis subsp. lactis*.

7- نواتج أُخرى:

هنـاك العديـد مـن المـواد الأُخـرى التـي يكـون لبكتيريـا البـادئ القـدرة علـى إنتاجهـا أو استهلاكها مثل بعض الفيتامينات التي تستهلكها أو تنتجها أثناء نموها حيث أشار بعض الباحثين إلى تكوين فيتامين B_1 و B_6 و B_{12} وحامض الفوليك أثناء تخمر الزبادي في حين أشار آخرين أن نسبة فيتامين B_1 و B_{12} وحامض الفوليك والبيوتين تقل أثناء تخزين الزبادي وقد عزوا ذلك إلى استهلاكها بواسطة بكتيريا البادئ. وبالتالي فإن القول إن بكتيريا البادئ تؤدى إلى زيادة أو نقصان بعض الفيتامينات لا يمكن الجزم به لأن ذلك يتوقف على السلالة وعلى ظروف التصنيع والتخزين.

كذلك فإن تخمرات بكتيريا البادئ تزيد من تركيز الأحماض العضوية مثل الفيوماريك Fumaric و السكسينيك Succinic والبنزويك Benzoic بينما يقل تركيز كل من حامض الهيبوريك Hippuric والاروتيك Orotic وتركيز النيوكلتيدات في الزبادي عن الحليب المصنع منه.

العوامل المثبطة لمزارع البادئ:

هناك عوامل عديدة تؤدي إلى تثبيط و/ أو خفض نشاط مزارع البادئ، فالحالة الأولى تقود إلى عدم إنتاج المنتجات اللبنية المتخمرة، والحالة الثانية تؤدي إلى إنتاج منتجات لبنية متخمرة منخفضة الجودة عند وصولها للمستهلك، كما تؤدي كلا الحالتين إلى خسائر اقتصادية كبيرة للمصنع نتيجة ضعف البادئ.

يطلق أحيانا على البادئ تعبير البادئ الضعيف عندما لا يتطور حامض اللاكتيك بالسرعة الملائمة ويمكن الكشف على نشاط البادئ بتلقيح 1 مل من البادئ في 10 مل من الحليب المعامل حراريا والخالي من المضادات الحيوية ثم تحضينه على درجة الحرارة الملائمة لنموه، فإذا لم يحصل تطور مقبول بالحموضة بعد فترة معقولة من الزمن فإن هذا البادئ يطلق عليه بادئ ضعيف. وتعتمد درجة الضعف على نسبة الحامض المتكون فإذا لم يتكون الحامض مطلقا فيعني هذا بأن البادئ غير فعال ويعبر عنه بالبادئ الميت.

إن أسباب ضعف البادئ معروفة وقد يكون ضعف البادئ نتيجة عدم التلقيح الدوري المنتظم أو عدم توحيد درجة حرارة حضن البادئ أو طول فترة الحضن وكذلك وجود المواد المثبطة للنمو، ومن ضمن المواد المثبطة للنمو المضادات الحيوية أو المركبات الشبيهة بالمضادات الحيوية التي قد تنتجها بعض البكتيريا ومواد التطهير والتعقيم والبكتيريوفاج وبعض المثبطات الطبيعية الموجودة أصلاً في الحليب.

<u>وتتلخص أسباب ضعف مزارع البادئ فيما يلي:</u>

1- البكتيروفاج Bacteriophage:

سبق الحديث عن البكتيروفاج ودوره في مهاجمة مزارع البادئ وبالتالي عدم إتمام عملية التخمر المنشودة، ومن الممكن تقسيم مزارع البادئ إلى ثلاث مجاميع رئيسة طبقا لحساسيتها للبكتريوفاج فهناك ما هو غير حساس للبكتريوفاج (لا يتأثر)، وهناك نوع حامل للبكتريوفاج (حيث انخفاض بسيط في معدل تكوين حامض اللاكتيك المنتج)، أما النوع الثالث من المزارع فتكون حساسة للبكتريوفاج (حيث تتحلل البكتيريا تحللاً كاملاً)، والشكل رقم (217) يوضح إصابة بكتيريا *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* بالبكتيروفاج.

<u>وللوقاية من المشاكل التي يسببها البكتيريوفاج في صناعة الألبان يمكن اتخاذ الاحتياطات التالية:</u>

1- يجب تنشيط مزارع البادئ تحت ظروف معقمة ويفضل استخدام الأنظمة المحمية ميكانيكياً والتي ذكرناها سابقاً.

2- المعاملة الحرارية لحليب البادئ النهائي (بادئ التصنيع) يجب أن تكون كافية للقضاء على هذه الفيروسات، ويجب ملاحظة أن يملى خزان البادئ تماما دون ترك حيز هوائي، وإلا فإنه من الضروري إجراء معاملة حرارية لمدة أطول للتخلص من البكتيريوفاج في الحيز الهوائي.

3- الترشيح الجيد للهواء في غرفة تحضير البادئ وفي منطقة الإنتاج يساعد في السيطرة على مشكلة البكتيريوفاج.

4- يجب تطهير المعدات المستخدمة في تحضير وتداول ونقل البادئات بطريقة ملائمة، باستعمال الحرارة أو المواد الكيميائية المطهرة.

5- موقع غرفة تحضير البادئ يجب أن يكون بعيدا عن منطقة الإنتاج مما يقلل من احتمال التلوث عن طريق الهواء.

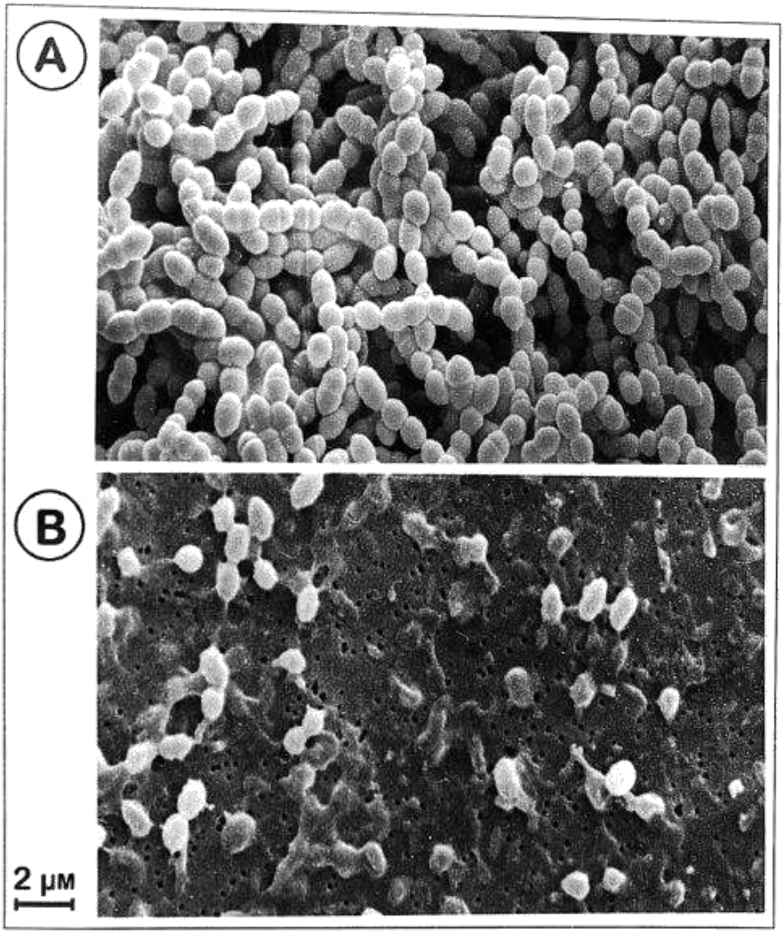
6- التأكد من أن عمال المصنع وخصوصا العاملون في صالة تصنيع الجبن أو الألبان المتخمرة لا يسمح لهم بدخول غرفة تحضير البادئ.

7- يرش الفراغ الهوائي لغرف إعداد البادئ بضباب محلول الهيبوكلورايت أو استخدام الأشعة فوق البنفسجية للحد من وجود البكتيريوفاج في الجو المحيط، وكذلك رش منطقة الإنتاج.

8- تطوير سلالات من مزارع البادئ مقاومة للبكتيريوفاج، واستخدام مزارع البادئ مختلفة السلالات.

9 - عدم استخدام سلالات مزارع البادئ الحساسة للبكتيريوفاج، وتنشيط مزرعة البادئ في البيئات المثبطة لنمو البكتيريوفاج.

إن وجود الكالسيوم في الوسط الغذائي يعتبر ضروريا لنشاط البكتيريوفاج وقدرته على مهاجمة للخلايا البكتيرية وتحطيمها وتحللها، فقد لوحظ عدم نمو البكتيريوفاج في بيئة خالية من الكالسيوم، وتعرف مثل هذه البيئات بالبيئات المقاومة للبكتيريوفاج **Phage resistant media (PRM)**، أو البيئات المثبطة للبكتيريوفاج **Phage inhibitory media (PIM)**. ومن الممكن استخدام الفوسفات لتجميع ايونات الكالسيوم الحرة في الحليب، فقد تستخدم كما أشرت سابقاً بيئات خاصة تحتوى على الفوسفات لمنع نشاط البكتيريوفاج وخصوصاً في صناعة الجبن حيث يعمل الفوسفات على الارتباط بأيونات الكالسيوم اللازمة لمهاجمة البكتيريوفاج للبكتيريا غير أن هذه البيئات لا تستخدم في تحضير بيئات بادئ التصنيع لصناعة الألبان المختمرة حتى لا تنتقل المواد المضافة إلى المنتج. لكن حالياً تتوفر في الأسواق العديد من البيئات المقاومة أو المثبطة للبكتيريوفاج **Phage resistant or inhibitory media**، يمكن استعمالها في تحضير بيئات بادئ التصنيع لصناعة الألبان المختمرة، حيث تتكون هذه البيئات بصورة رئيسية من المواد الصلبة للحليب وسكر ومواد محفزة للنمو ومواد منظمة للـ **pH**، مع أن بعض الباحثين يشككون في إمكانية نجاح مثل هذه البيئات في الحد من مشكلة البكتيريوفاج في مزارع البادئ.



الشكل رقم (229) يوضح إصابة بكتيريا *S. salivarius subsp. thermophilus* بالبكتيريوفاج، حيث يلاحظ في الصورة (A) الخلايا قبل الإصابة أما الصورة (B) الخلايا بعد الإصابة، عن (Fox, *et al.* 2000).

2- المضادات الحيوية:

تدخل المضادات الحيوية إلى الحليب بسبب معاملة الحيوان بمثل هذه المضادات للسيطرة على مرض التهاب الضرع. وتبقى هذه المواد في الضرع وتلوث الحليب مدة 72 ساعة بعد المعاملة ولهذا يحب عدم حلب الحيوان خلال هذه المدة. وترجع أهمية مشكلة وجود المضادات الحيوية في الحليب إلى سببن الأول أن مزارع البادئ تعتبر حساسة للتركيزات المنخفضة جدا من المضادات الحيوية وبالتالي تسبب منع نمو بكتيريا البادئ وتوقف عملية التخمر وتؤدي إلى عدم إنتاج المنتجات اللبنية المتخمرة والتسبب بخسائر اقتصادية كبيرة، أما السبب الثاني فيتمثل في أن بعض الناس يعانون من حساسية ضد بعض المضادات الحيوية المستعملة في معالجة الأبقار المصابة، وبالتالي فأن استهلاكهم للحليب الحاوي عليها يشكل خطر على صحتهم.

3- بقايا مواد التطهير والتنظيف:

قد يتلوث الحليب أو منتجاته بالمركبات المستخدمة لأغراض تنظيف المعدات المستخدمة في إنتاجه وتصنيعه، وتؤثر بقايا هذه المركبات على نشاط مزرعة البادئ، إلا أن ذلك يحتاج إلى تراكيز كبيرة من هذه المواد بالمقارنة مع المضادات الحيوية. ومن الممكن التعرف على وجود هذه المواد عن طريق التذوق حيث يتغير طعم الحليب عند وجود مثل هذه المواد بتراكيز معينة. إن تلوث حليب البادئ بهذه المركبات يكون نتيجة الإهمال وعدم الشطف الجيد لأسطح الأجهزة والأنابيب التي تكون على تماس بالحليب (أخطاء بشرية) وخصوصاً في المصانع الصغيرة التي لا تعتمد على دورة الغسيل الأوتوماتيكية أو عطل في دورة الغسيل الأوتوماتيكية في تلك المصانع الكبيرة التي تعتمد على طريقة التنظيف المركزي Cleaning in place (CIP)، وهنا يصبح من الضروري التأكد من أن دورة الشطف تستغرق وقتا كافيا لإزالة هذه المركبات الكيميائية من الخزان المعد لتحضير بادئ التصنيع وكذلك من الخطوط التي يمر بها وصولاً إلى أحواض تصنيع الجبن أو خزانات تحضير الألبان المتخمرة.

4- مواد أُخرى مثبطة للنمو:

يحتوي الحليب على أجسام مضادة طبيعية بإمكانها وقف نمو مزارع البادئ، وهذه الأجسام المضادة حساسة للحرارة حيث تؤدي معاملة الحليب حراريا إلى القضاء عليها. وهناك أيضاً كريات الدم البيضاء الموجودة في الحليب المتحصل عليه من أبقار مصابة بالتهاب الضرع، حيث تلتهم ميكروبات البادئ. كما لوحظ أن الحليب المتحصل عليه في الربيع أو في نهاية فترة الإدرار له بعض التأثير على نشاط مزرعة البادئ ولكن لم يعرف السبب أو الأسباب لذلك بعد، ومن المحتمل أن يكون الثيوسيانات هو المسئول عن ذلك. وقد توجد عوامل أخرى مثبطة للنمو في الحليب قد ترجع إلى التلوث البيئي مثل المبيدات الحشرية والتي بإمكانها تثبيط نمو ميكروبات البادئ.

منتجات الألبان المتخمرة Fermented Dairy Products:

هناك كما أسلفنا العديد والعديد من منتجات الألبان المتخمرة ولكل شعب من الشعوب منتجاته الخاصة من الألبان المتخمرة، ومن المستحيل أن نتمكن من أن نشمل جميع هذه المنتجات هنا، ولكن وبالطبع سوف يتم التركيز على أكثر هذه المنتجات شهرة وانتشار، ومن أشهر منتجات الألبان المتخمرة التي سوف نتعرف عليها منتج حليب الخض المتخمر كذلك منتج اليوغورت الذي يعرف في بلادنا وباقي الدول العربية باسم الزبادي، كأمثلة على الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك، وكذلك بعض المنتجات اللبنية المتخمرة الخاصة (الصحية أو العلاجية)، وسوف نعرج سريعاً على منتجي الكيفير والكوميس المشهوران في دول القوقاز وروسيا، كمثال على الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والخمائر، مع العلم أنه محرم علينا نحن المسلمين استهلاكهما لأنهما يحتويان على نسبة من الكحول الإيثيلي بسبب احتواء بادئهما على خمائر منتجة للكحول، ،اخيراً سنتعرف على منتج الفيلي كمثال على الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والأعفان.

<u>أولاً:</u>- الألبان المتخمرة المنتجة ببادئات بكتيريا حامض اللاكتيك المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة:

حليب الخض المتخمر Cultured butter milk:

حليب الخض هو ذلك الناتج الذي يتخلف بعد خض القشدة إلى زبد، وينتج الحليب الخض المتخمر بتخمير حليب الخض أو الحليب الفرز (وهو الأكثر شيوعاً حالياً) باستخدام بادئ الزبد لإكسابه طعم ونكهة مرغوبين. ويضيف الكثير من المنتجين 1 – 2 % دهن إلى الحليب الخض المتخمر لتحسين طعمه ومظهره ويوجد هذا الدهن على صورة حبيبات صغيرة تشبه حبيبات الزبد، ويمكن الحصول على ذلك بعدة طرق حيث يضيف بعض المنتجين الدهن إلى الحليب قبل إضافة البادئ، وبعد إتمام التخمر يخض الناتج حتى يصل حجم حبيبات الدهن إلى الحجم المطلوب، في حين يقوم البعض الأخر بخض القشدة أولاً للحصول على حبيبات زبد دقيقه ثم تضاف مباشرة إلى الحليب المتخمر.. وقد يضاف قليل من الملح إلى حليب الخض المتخمر لتحسين الطعم وقد يقوم بعض المنتجين أيضاً بخلط عصائر الفاكهة مع حليب الخض المتخمر لإنتاج مشروب يفضله الكثيرون من المستهلكين في الخارج.

أما البادئ المستخدم في إنتاج حليب الخض المتخمر فهو عبارة عن خليط من بكتيريا حامض اللاكتيك المنتجة للحموضة وتلك المنتجة للنكهة، وتتمثل بكتيريا حامض اللاكتيك المنتجة للحموضة بالنوعين *Lactococcus lactis subsp. lactis* و *L. lactis subsp. cremoris* أما البكتيريا المنتجة للنكهة فتتمثل في *L. lactis subsp. diacetilactis* وجنس الـ*Leuconostoc Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*، وكذلك

Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*. وفي صناعة حليب الخض المتخمر يكون الفعل الرئيسي لبكتيريا حامض اللاكتيك المنتجة للحموضة هو إنتاج حامض اللاكتيك الذي يعطي المذاق الحامض ويخثر الحليب ويخفض الـpH إلى الحد الذي تقوم عنده بكتيريا حامض اللاكتيك المنتجة للنكهة بإنتاج أقصى كمية من الأحماض الطيارة ومكونات النكهة الأُخرى ، وتلعب بكتيريا *Leuconostoc* الدور الرئيسي في إنتاج حامض الخليك والأسيتيل مثيل كربينول وثنائي الأسيتيل من حامض الستريك.

ويمكن إنتاج حليب الخض المتخمر في المعامل الصغيرة أو المصانع المتوسطة بمعاملة الحليب الكامل الدهن أو الفرز السائل أو الحليب الفرز المسترجع حرارياً كما سبق وأن أشرت من قبل، ثم يبرد الحليب إلى درجة حرارة التحضين وهي 21°م، بعد ذلك يضاف إليه كمية من البادئ تتراوح بين 0.5 – 2 %، وتتوقف كمية البادئ المضافة على درجة نشاط البادئ، ثم تتم عملية خلط البادئ بشكل جيد مع الحليب مع تجنب الرج أثناء عملية التحضين التي تستمر إلى أن تصل حموضته إلى مدى بين 0.80 – 0.90 % (مقدرة كحامض لاكتيك) بعدها يبرد المنتج إلى درجة حرارة 5°م، ثم تتم عملية التعبئة للمنتج. وعند تصنيع كميات كبيرة من حليب الخض المتخمر في خزانات كبيرة يكون من اللازم البدء في التبريد والحموضة ما تزال أقل من 0.80 % لتفادى زيادة الحموضة خلال فترة التبريد الطويلة، وقد يكون من المفضل الاحتفاظ بالحليب المختمر في خزانات التبريد قبل التعبئة لفترة عدة ساعات عند الرغبة في زيادة لزوجته. ويتم تخزين عبوات الحليب الخض المختمر على درجة حرارة تتراوح بين 5 - 10°م حتى يتم توزيعه.

وتؤدى زيادة الرج والتقليب إلى ضعف ثبات خثرة حليب الخض المتخمر وإلى زيادة انفصال الشرش ويظهر تأثير التقليب والرج واضحاً في القوام بصفة خاصة أثناء فترة تخثر الحليب وعندما تكون الخثرة ما تزال ضعيفة، ويعتبر عيب ضعف القوام من أهم عيوب حليب الخض المتخمر، ويكون مصحوباً بانفصال الشرش، فالخثرة الجامدة تحتفظ بكل الماء الموجود أصلاً بالحليب ولكن على صورة مربطه إلى حد ما بالبروتين بطريقة تشبه حجز الإسفنج للماء، وعند ضعف قوام هذه الخثرة يخرج جزء من هذا الماء بما يحمله من مواد ذائبة، مما يتسبب بظهور ذلك العيب المعروف بانفصال الشرش الذي يظهر على سطح حليب الخض المتخمر، وقد يلجأ بعض المنتجين إلى إضافة كميات صغيرة من بعض المواد المثبتة للقوام مما يزيد من لزوجة حليب الخض المتخمر المنتج. ومن العيوب الأخرى عيب عدم اكتمال الطعم والنكهة ويعود ذلك لضعف البادئ وخصوصاً بكتيريا *Leuconostoc* المنتجة للنكهة. وقد يتلوث حليب الخض المتخمر ببكتيريا القولون التي تكسبه طعم ونكهة حادين إضافة إلى تكون عيوب غازية نتيجة التخمر الغازي.

ثانياً- الألبان المتخمرة المنتجة ببادئات بكتيريا حامض اللاكتيك المحبة لدرجة الحرارة العالية:

الزبادي (اليوغورت) Yoghurt:

ينشر إنتاج الزبادي Yoghurt في معظم بلدان العالم كواحد من أكثر الألبان المتخمرة شيوعاً. ولهذا المنتج العديد من الأسماء، بحيث أن له أو للمنتجات الشبيهة به اسم مختلف في كل بلد من تلك البلدان التي تنتجه، ففي السودان ومصر واليمن هناك ما يسمى بالزبادي Zabady، وفي العراق هناك ما يعرف باللبن الرائب والروب Rob، وفي لبنان وسوريا هناك اللبن واللبنة، وفي الهند Dahi، وفي تركيا Jugurt، وفي اليونان Yiaourti، وهكذا. ويمكن تقسيم أنوع الزبادي والتي تنتج في أنحاء العالم إلى مجاميع مختلفة على أساس ما يلي:

1- التركيب الكيميائي.
2- الخصائص الفيزيائية للخثرة.
3- النكهة.
4- معاملات ما بعد التحضين.

1- التركيب الكيميائي Chemical Composition:

تعتمد المواصفات القياسية للزبادي بصورة رئيسة على تركيبه الكيميائي مثل نسبة الدهن والمواد الصلبة الكلية والمواد الصلبة غير الدهنية له، إلا أن غالبية المواصفات القياسية تعتمد بصورة رئيسة على نسبة الدهن فيه، وطبقا لمنظمة الزراعة والأغذية FAO يصنف الزبادي إلى الزبادي كامل الدهن (أعلى من 3 %)، وزبادي متوسط الدهن (0.5 – 3 %) وزبادي مخفض الدهن (أقل من 0.5 %).

2- الخصائص الفيزيائية للخثرة Physical Characteristic of Coagulum:

تميز الصناعة بين نوعين رئيسين من الزبادي هما الثابت أو الساكن Set Yoghurt والنوع المخلوط أو المقلب Stirred Yoghurt ويعتمد هذا التقسيم على نظام التصنيع والتركيب الفيزيائي للخثرة Coagulum، ففي النوع الثابت يتم التحضين والتخمر في عبوات المنتج المعدة للتوزيع، لذا فإن الخثرة تمتاز بكونها شبه صلبة، بينما النوع المخلوط يتم إنتاجه بعد حدوث عملية التخمر في خزانات كبيرة الحجم، ومن ثم تم تكسير الخثرة قبل تبريده نهائيا ثم تتم عملية وتعبئته في عبواته النهائية تمهيداً لتسويقه. الزبادي من النوع المخلوط يعتبر سائلاً، وتكون لزوجته منخفضة، وقد تصل نسبة المواد الصلبة الكلية به إلى 11 % أو أقل بينما الزبادي الثابت أو الساكن تصل نسبة المواد الصلبة الكلية به إلى 16 %.

3- النكهة:

أدت عمليـة إدخـال النكهـات للزبـادي إلـى ظهـور ثلاثـة أنـواع مختلفـة منـه، هـي : الزبـادي الطبيعي أو السادة والذي يعتبر منتجا تقليديا لـه طعم حامضـي ، والزبـادي بالفواكـه والـذي يصـنع بإضافة الفواكه والمواد المحلية للزبادي الطبيعي، والنوع الثالث يسمى الزبـادي ذو النكهـة والـذي تستبدل فيه مكونات الفاكهة الطبيعية بمواد نكهة وملونات صناعية.

4- معاملات ما بعد التحضين:

يمكن الحصول على عدة أنوع محورة من الزبادي في الأسواق في الوقت الحالي. ومن أهم هذه الأنواع الأكثر شيوعا الزبادي المعامل حرارياً الذي يصنع باستخدام الطرق التقليديـة للإنتـاج، ثم يعامل الزبـادي حراريا بعد التخمر لإطالـة فترة حفظـه. وكمـا أشرت سابقاً فإن إطلاق تسمية منـتج لبنـي متخمر علـى مثـل هذا المنـتج مازالـت مثـارا للجدل، الزبـادي المجمـد: ويعد بالطريقـة التقليدية ، ولكن يتم تجميده بالإضافة إلى كونـه قد يتطلب إضافة كميات من السكر والمثبتـات أعلـى من المعتـاد للحفـاظ علـى تماسك الخثـرة خلال التجميد. كمـا توجد أنـواع أخـرى مـن الزبـادي مثـل زبـادي الحميـة (الـريجيم) **Dietetic yoghurt**، والـذي ينـاسب الأشـخاص الـذين يحتـاجون لنظـام غذائي خـاص، وعـادة يكـون هـذا النـوع منخفضـاً فـي السـعرات الحراريـة وهنـاك الزبـادي المـدعم بالفيتامين والبروتين، والزبادي المعامل بالإنزيمات أو ذلك الـذي أُستبدل دهن الحليب فيـه بالـدهن النباتي. كذلك هناك الزبادي المركز الذي يحتوي على مواد صلبة كلية قد تبلـغ 24 %، والزبـادي المجفف الـذي يحتـوي علـى مـواد صـلبة كليـة تتـراوح بـين 90 - 94 %. والشـكل التـالي يوضـح الأسس العامة لتقسيم منتج الزبادي **Yoghurt** إلى مجاميع وأمثلة على أنواع كل مجموعة.

الشكل رقم (230) يوضح تقسيم منتج الزبادي إلى مجاميع وأمثلة على تلك الأنواع لكل مجموعة، عن (Tamime and Robinson, 1999).

إنتاج الزبادي:

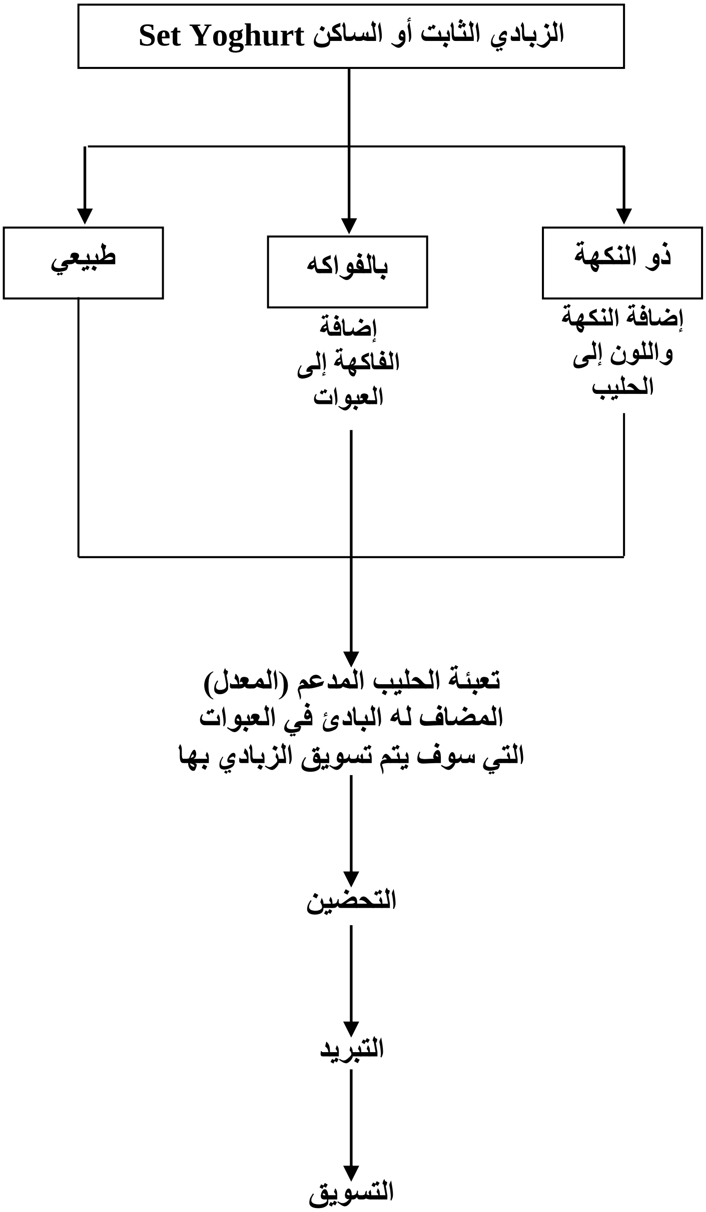
إن الخطوات الأساسية المستعملة في تصنيع بعض الأنواع المختلفة من الزبادي متشابهة بشكل كبير، فهناك تماثل في مراحل الإنتاج لكل من النوعين الثابت والمخلوط من الزبادي ويبدأ الاختلاف فقط بعد إضافة البادئ. وتتضمن أهم وأول هذه الخطوات المعاملة الأولية للحليب حيث تشتمل عملية إعداد المخلوط الأساسي على تدعيم تركيب الحليب أو تعديله بزيادة مستوى المواد الصلبة الكلية في المخلوط للحصول على الصفات الريولوجية المرغوبة للمنتج المصنع، وقد يكون ذلك بتبخير جزء من الرطوبة في الحليب باستخدام جهاز التبخير Evaporator أو بإضافة حليب فرز مجفف، للوصول إلى نسبة المواد الصلبة الكلية المرغوبة، حيث تسهم هذه العملية في تحسين طبيعة الخثرة للزبادي المنتج بجعلها أكثر تماسكاً، فضلاً عن التحسينات التي تسهم فيها أيضا مرحلة التجنيس التي تلي عملية التدعيم الذي يؤدي ذلك إلى إعطاء قوام ناعم للخثرة.

أما الخطوة التي تلي ذلك فتتمثل بالمعاملة الحرارية والتي تختلف فيها درجة الحرارة التي يعامل بها الحليب المستخدم لصناعة الزبادي، فقد تكون منخفضة مثل استخدام درجة حرارة البسترة العادية (72°م لمدة 15 ثانية) أو قد تكون مرتفعة باستخدام المعاملة بالحرارة الفائقة UHT، (ظروف التصنيع المتوافرة في المصنع غالباً ما تحدد درجة الحرارة والوقت حسب الإمكانات المتاحة) ويمكن تلخيص تأثيرات المعاملة الحرارية في التالي:

1- تحدث دنترة لبروتينات الشرش مع حدوث تجمع لجزيئات الكازين على شكل شبكة ثلاثية الأبعاد تحتجز خلالها بروتينات الشرش فتصبح خثرة الزبادي بعد ذلك أكثر لزوجة.
2- يقل المحتوى البكتيري في الحليب، فتواجه البادئات منافسة أقل من الميكروبات الأُخرى .
3- يحدث انخفاض في كمية الأكسجين في الحليب، وحيث إن بكتيريا بادئ الزبادي تتطلب كميات قليلة من الهواء Microaerophilic فإن انخفاض كمية الأكسجين يشجع على نموها.
4- قد يحدث تحلل محدود لبروتينات الحليب خلال التسخين، وتؤدي نواتج التحلل إلى تحفيز نشاط البادئ.

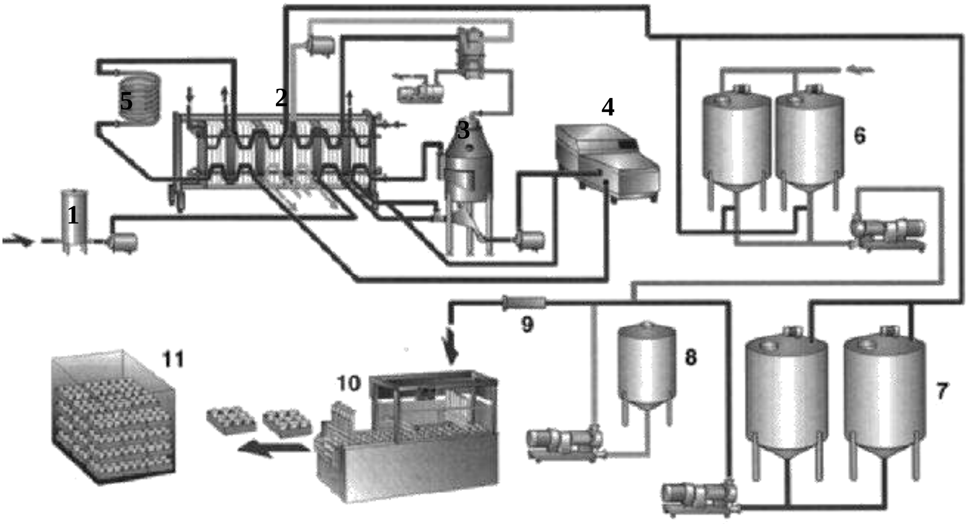
وبعد ذلك تتم عملية إضافة البادئ وهنا يبدأ الاختلاف في خطوات تصنيع كلٍ من الزبادي الثابت أو الساكن Set Yoghurt والزبادي المخلوط أو المقلب Stirred Yoghurt. وتتم عملية إضافة البادئ الذي يحتوي على بكتيريا *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* وكذلك بكتيريا *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* بعد أن يتم ضبط درجة حرارة الحليب على درجة حرارة بين 40 - 45°م وتستمر عملية التحضين على هذه الدرجة الحرارية لمده تتراوح بين 2.5 إلى 3 ساعات.

والأشكال والمخططات التاليـة توضح أهم الاختلافات فـي خطوات التصنيع بـين الزبـادي الثابت أو الساكن والزبادي المخلوط أو المقلب.



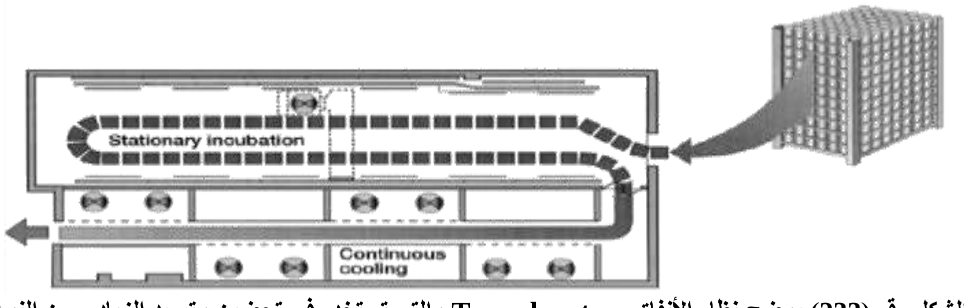
الشكل رقم (231) يوضح مخطط يوضح خطوات التصنيع للزبادي الثابت أو الساكن **Set Yoghurt**.

وتنحصر طريقة صناعة الزبادي الثابت أو الساكن Set Yoghurt في تلقيح الحليب المدعم (معدل التركيب) بالبادئ على درجة حرارة التحضين المستخدمة وقد يضاف إليه المواد المُكسبة للطعم والرائحة (لتصنيع الزبادي ذو النكهة) وفى حالة تصنيع الزبادي بالفاكهة تضاف الفاكهة أولاً في العبوة ثم تعبأ بعد ذلك بالحليب الملقح بالبادئ في عبوات التوزيع وتقفل وتخفض على درجة حرارة التحضين للمدة المطلوبة ثم تبرد. وتوجد عدة أنواع من معدات التحضين مثل كبائن التحضين Incubated Cabinet أو نظام الأنفاق Tunnel system والتي تستخدم عادة في حالات الإنتاج على مستوى واسع وبالنظام المستمر. والشكل التالي يوضح تلك العمليات



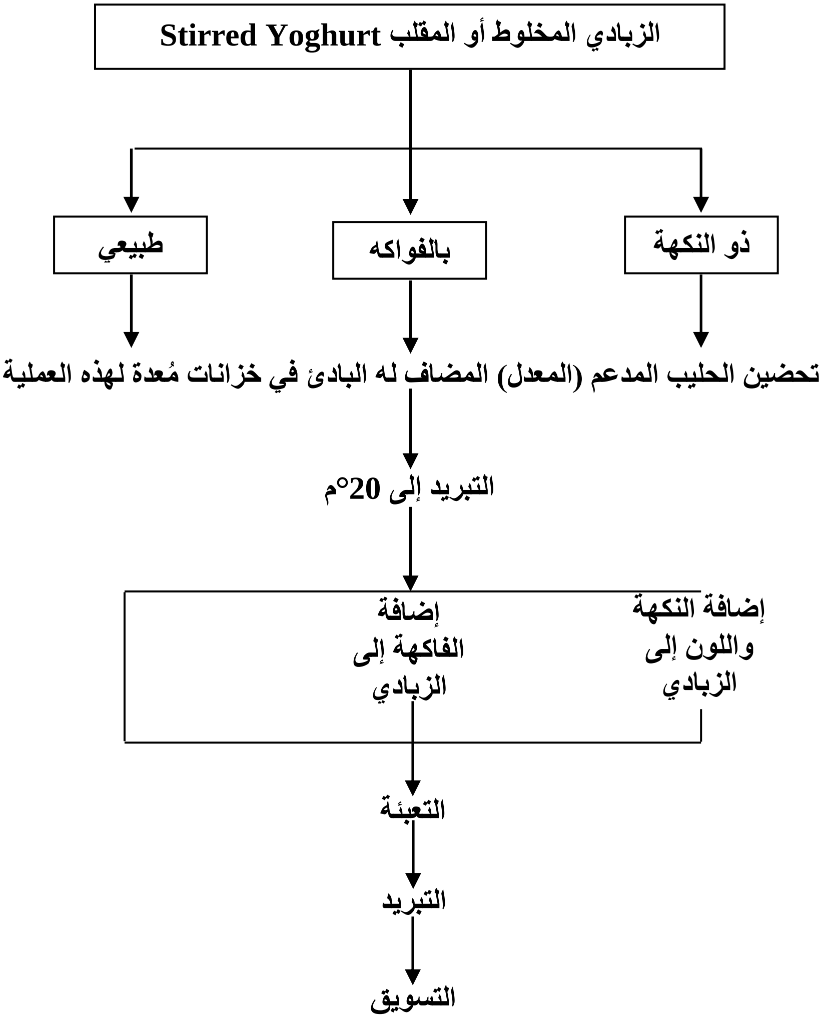
(1) حوض الموازنة، (2) المبادل الحراري، (3) المبخر، (4) المجنس، (5) أنبوب الحجز، (6) خزانات بادئ التصنيع، (7) خزانات الحليب المعدل التركيب، (8) خزان مواد النكهة واللون، (9) وحدة مزج الحليب بالبادئ، (10) ماكينة التعبئة، (11) كابينة التحصين.

الشكل رقم (232) خطوات التصنيع للزبادي الثابت أو الساكن، عن (Bylund, 1995).



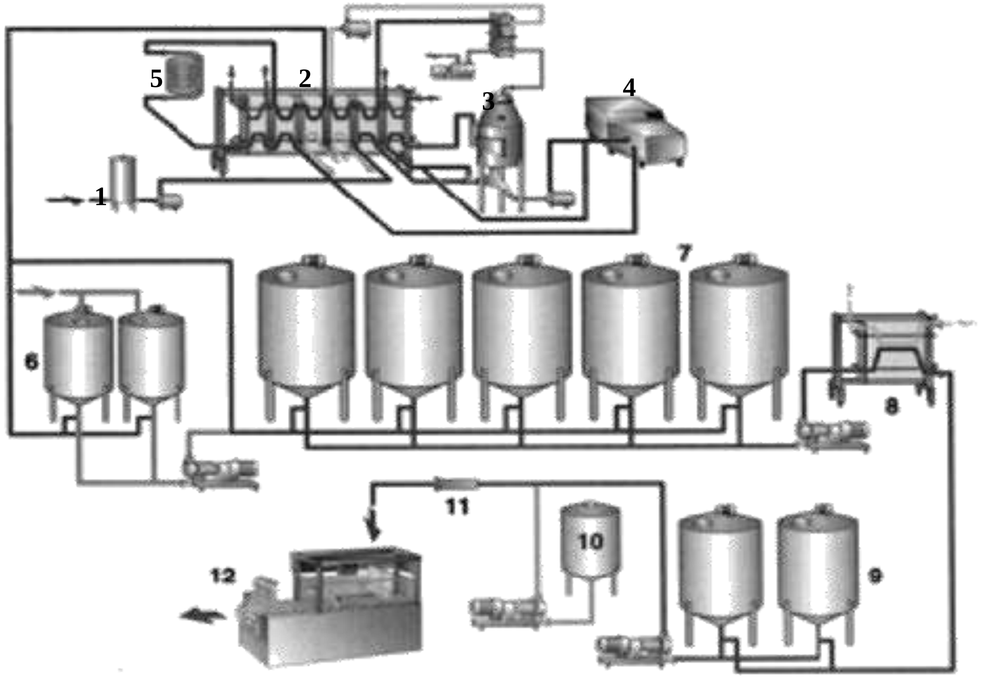
الشكل رقم (233) يوضح نظام الأنفاق Tunnel system والتي تستخدم في تحضين وتبريد الزبادي من النوع الثابت أو الساكن المنتج بالنظام المستمر، عن (Bylund, 1995).

أما الزبادي المخلوط أو المقلب فيصنع في أحواض بصورة مجمعة **Bulk** ثم تكسر الخثرة المتكونة بالتقليب قبل وأثناء التبريد وفى خطوة التعبئة وهناك أنوع متعددة من الأحواض المستخدمة في إنتاج الزبادي المخلوط أو المقلب مثل الأحواض متعددة الأغراض والمستخدمة لعمليات إذابة المواد الصلبة المضافة إلى الحليب والمعاملة الحرارية للحليب وكذلك التحضين وإنتاج الزبادي في نفس الوقت. وكذلك هناك أحواض للتحضين فقط وأنواع أُخرى للتحضين والتبريد، وهذه التجهيزات تختلف من مصنع لأخر. والمخطط التالي يوضح خطوات التصنيع للزبادي المخلوط أو المقلب **Stirred Yoghurt**.



الشكل رقم (234) يوضح مخطط يوضح خطوات التصنيع للزبادي المخلوط أو المقلب **Stirred Yoghurt**.

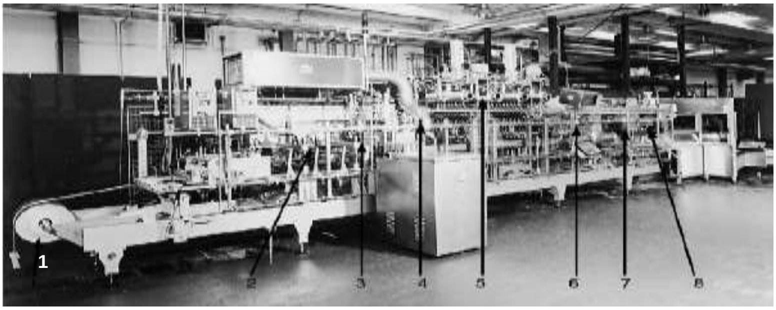
والشكل التالي يوضح خطوات التصنيع للزبادي المخلوط أو المقلب.



(1) حوض الموازنة، (2) المبادل الحراري، (3) المبخر، (4) المجنس، (5) أنبوب الحجز، (6) خزانات بادئ التصنيع، (7) خزانات التخمر، (8) مبرد صفائحي، (9) خزانات حجز، (10) خزان النكهة، (11) وحدة مزج الزبادي مع النكهة، (12) ماكينة التعبئة.

الشكل رقم (235) خطوات التصنيع للزبادي المخلوط أو المقلب، عن (Bylund, 1995).

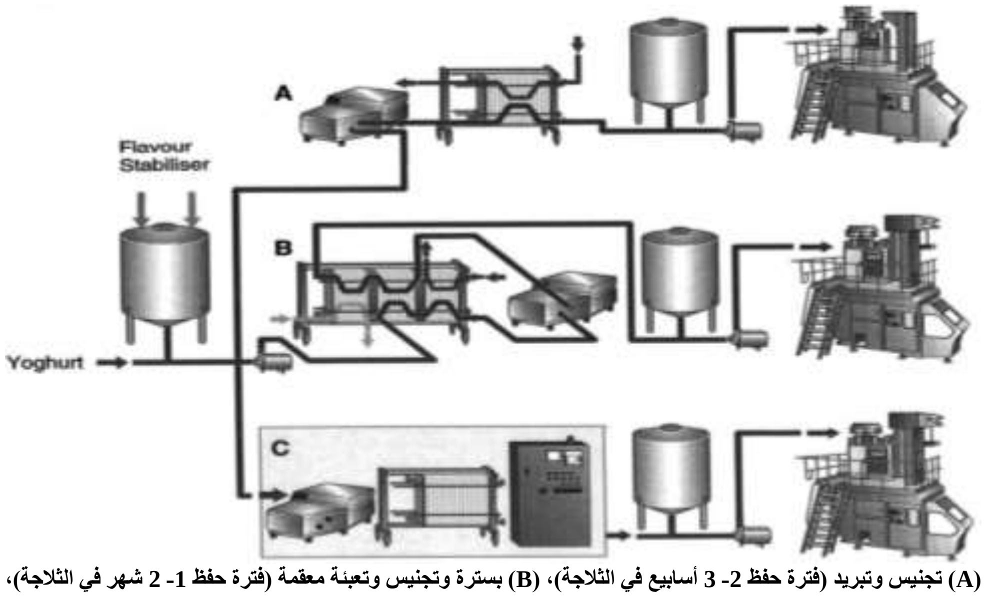
أما في ما يخص عملية تعبئة الزبادي فهناك العديد من ماكينات التعبئة المختلفة منها ما يستخدم عبوات سابقة التجهيز مثل تلك الماكينات المصنعة بواسطة شركة **Hamba** الألمانية التي تستخدم الأشعة فوق البنفسجية لتعقيم العبوات البلاستيكية سابقة التجهيز، ومنها ما يقوم بتشكيل العبوات وملئها وقفلها في ظروف معقمة أيضاً باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ومثال عليها تلك الماكينات المصنعة بواسطة شركة **Hassia Verpacking** الألمانية، وهناك نوع أخر من ماكينات التعبئة تقوم بعملية التعبئة المعقمة وفيها يتم تعقيم العبوات البلاستيكية وأغطية الالومنيوم بمحلول H_2O_2 والهواء الساخن كذلك يدفع في منطقة التعبئة بالهواء المعقم بضغط أعلى من اضغط الجوى العادي ومنع أي هواء يحتوى على H_2O_2 من التسرب إلى منطقة ملء العبوات أو منطقة خروج العبوة. وهذه الماكينات يمكن تنظيفها بنظام التنظيف في المكان **CIP**. والشكل التالي يوضح أحد هذه الماكينات المستخدمة في عملية تعبئة الزبادي وهي تعمل بنظام تشكيل العبوات وملئها وقفلها في ظروف معقمة من إنتاج **Hassia Verpacking** الألمانية.



(1) بَكَرة مادة التغليف، (2) جزء التسخين المبدئي، (3) وحدة التشكيل الحراري، (4) تعقيم العبوات، (5) وحدة التعبئة، (6) بخار لتعقيم مادة تغطية العبوات، (7) غلق العبوات، (8) تثقيب العبوات.

الشكل رقم (236) يوضح ماكينة مستخدمة في عملية تعبئة الزبادي تعمل بنظام بتشكيل العبوات وملئها وقفلها في ظروف معقمة من إنتاج شركة **Hassia Verpacking**، عن (**Tamime and Robinson, 1999**).

وإضافة إلى ما سبق ذكره من أنواع الزبادي الثابت أو الساكن والزبادي المخلوط أو المقلب، هناك منتج أخر لا يقل شهرة وانتشار هو مشروب الزبادي **Drinking Yoghurt**، وتتشابه طريقة تصنيعه مع طريقة تصنيع والزبادي المخلوط أو المقلب وقد يتم معاملته حرارياً لإطالة فترة حفظه، والشكل التالي يوضح خطوات تصنيع مشروب الزبادي.



(A) تجنيس وتبريد (فترة حفظ 2- 3 أسابيع في الثلاجة)، (B) بسترة وتجنيس وتعبئة معقمة (فترة حفظ 1- 2 شهر في الثلاجة)، (C) تجنيس وUHT وتعبئة معقمة (فترة حفظ عدة أشهر في درجة حرارة الغرفة).

الشكل رقم (237) يوضح خطوات تصنيع مشروب الزبادي، عن (**Bylund, 1995**).

وأهم الاختلافات بين منتجات الزبادي الثابت أو الساكن والزبادي المخلوط أو المقلب ومشروب الزبادي **Drinking Yoghurt** تكمن في نسبة المواد الصلبة الكلية التي تكون أقل في مشروب الزبادي مما هي عليه في أنواع الزبادي الأُخرى.

ويحتوي بادئ الزبادي على *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* و *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* وتسمح التشريعات في بعض دول العالم مثل نيوزيلندا أو سويسرا بإضافة أنوع أخرى من بكتيريا حامض اللاكتيك في بادئ الزبادي، ولكن بصورة عامة يتم استخدام هذين النوعين المهمين من البكتيريا. وتكمن أهمية هذا الأمر في أنه يساعد على إعطاء زبادي ذي صفات مميزة تختلف عن الألبان المتخمرة الأُخرى، ووجود هذين النوعين من البكتيريا يشجع كما أسلفت من قبل التعاون المشترك بينهما، حيث لوحظ أن إنتاج حامض اللاكتيك يكون أكثر عند استخدام هذين النوعين وذلك مقارنة باستخدام بادئ مفرد لكل منها، كما أن عدد الخلايا للنوع *S. salivarius* subsp. *thermophilus* يزداد بسرعة في وقت محدد في البادئ الخليط عنه في البادئ المفرد، مما إلى افتراض وجود منفعة متبادلة بين هذين النوعين من البكتيريا، فقد عرفنا أن نمو *S. salivarius* subsp. *thermophilus* بشكل قوي في البادئ الخليط سببها أن لبكتيريا *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* نشاط تحللي لبروتينات الحليب مما يمد بكتيريا النوع الأول بما يحتاجه من أحماض أمينية لازمة لنموها. أما تحفيز نمو بكتيريا *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* فيرجع إلى عامل ناشئ عن النشاط الأيضي لبكتيريا *S. salivarius* subsp. *thermophiles* مما يمنح بكتيريا النوع الثاني ما تحتاجه من مركبات أيضية مثل حامض الفورميك الذي تكون نسبته قليلة في الحليب وكذلك مشتقات هذا الحامض و ثاني أكسيد الكربون CO_2 والبيورينات والبريميدينات **Purines and Pyimidines** اللازمة لنموها.

أن بعض الباحثين يقترحون أن النمو الأفضل لهذين النوعين يتم عند تنميتهما منفصلين ثم يخلطا فورا قبل استعمالهما، إلا أن الإجراء الشائع هو إنتاج خليط منهما بمعدل 1:1. وبالرغم من أن النسبة بين النوعين تبدأ كحد أدنى بتوازن 1:1 إلا أنها تتغير بسرعة عند دخول بكتيريا *S. salivarius* subsp. *thermophilus* في طـــور النمو اللوغـاريتمي ولا تصبح بكتيريا *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* سائدة إلا في حالة بدء تجمع حامض اللاكتيك، ونتيجة لذلك نجد أنه بنهاية عملية التخمر عندما تصل الحموضة إلى حوالي 0.90 – 0.95% (مقدرة كحامض لاكتيك) تبدأ الأعداد البكتيرية من النوعين المكونين لبكتيريا البادئ بالتوازن، وقد يصل العدد الكلي لبكتيريا البادئ في نهاية عملية التخمر إلى ما يقارب 200×10^7 لكل مليلتر من الزبادي. إن هذا العدد من بكتيريا البادئ يسهم بشكل كبير في الخواص الحسية للمنتج، ومن أهم التغيرات التي تحصل في الحليب المعد لصناعة الزبادي نتيجة نشاط بكتيريا البادئ ما يلي:

1- يتحلل اللاكتوز في داخل الخلية البكتيرية بفعل إنزيم β-D-galactosidase إلى جلوكوز وجالاكتوز، ويستخدم الجلوكوز في إنتاج حامض اللاكتيك من نوع (-)D و(+)L، في حين يتجمع الجالاكتوز. ولكي تؤثر البكتيريا على سكر اللاكتوز فإن أول خطوة لذلك هي انتقال سكر اللاكتوز من الحليب إلى داخل الخلية البكتيرية ماراً بغشاء الخلية وبمساعدة إنزيم Permease، ويتحلل سكر اللاكتوز بعد دخوله إلى داخل الخلية إلى جلوكوز وجالاكتوز وذلك بفعل الإنزيم المحلل للاكتوز والمسمى β-D-galactosidase ويتراكم الجالاكتوز بصورته في الوسط نظراً لأن معظم سلالات بكتيريا *S. salivarius* subsp. *thermophilus* وسلالات بكتيريا *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ليست لها القدرة على تمثيل الجالاكتوز، بينما نجد أن الجلوكوز يتحول داخل الخلية إلى حامض بيروفيك وهذا بدوره يتحول إلى حامض اللاكتيك الذي يمر إلى خارج الخلية للمحافظة على الـpH الموجود داخل الخلية البكتيرية. وعند وصول الحموضة في الزبادي إلى ما بين 1- 1.3 % فإن نشاط وتكاثر بكتيريا البادئ يقل بدرجة ملحوظة، ويؤثر في ذلك عاملين هما أولاً تراكم الجالاكتوز الذي يعمل على تثبيط عمل إنزيم β-D-galactosidase وبالتالي الحد من تكاثر البكتيريا. ثانياً تكوين حامض اللاكتيك له تأثير مثبط على نشط بكتيريا البادئ وخصوصاً *S. salivarius* subsp. *thermophilus*، ففي أثناء التخمر ينخفض pH الوسط تدريجياً في حين يظل pH الخلية ثابتاً عند 6.6 نتيجة إخراج البروتونات إلى خارج الخلية مما ينشأ عنه تدرج في الـpH (pH gradient) على جانبي غشاء الخلية. ومن اجل إخراج البروتونات من الخلية فإن البكتيريا تستهلك طاقة على صورة ATP، وفى نهاية الطور اللوغاريتمي فإن كمية الـ ATP المتاحة لا تكون كافية ويتبع ذلك اختفاء تدرج الـpH ويعمل ذلك على تثبيط النشاط الإنزيمي وبالتالي تثبيط نمو البكتيريا.

2- المركب المعقد والذي يتكون من الكالسيوم - الكازينات - الفوسفات فإنه يصبح غير مستقر بفعل حامض اللاكتيك، وهذا يقود إلى تكوين الخثرة في الزبادي. حيث أن تراكم حامض اللاكتيك في الوسط يخفض pH الحليب حتى يصل إلى 4.6 وهي نقطة التعادل الكهربي للكازين، حيث تتعادل شحنات الكازين فتتكون الخثرة. والخثرة المتكونة بهذه الطريقة تمنح الزبادي خثرة طريه وهى أفضل في الهضم إذا ما قورنت بالحليب العادي الذي يتجبن في المعدة لإعطاء خثرة أكثر صلابة، وقد لوحظ أن زمن مرور خثرة الزبادي في القناة الهضمية ضعف زمن مرور الحليب مما يحسن من امتصاص المكونات الغذائية الموجودة في الزبادي.

3- تتكون مكونات النكهة في الزبادي نتيجة لتخمر سكر اللاكتوز، وتتمثل هذه المركبات بالاسيتالدهيد Acetaldehyde (الذي يشكل 2.4 - 41 جزء في المليون) والأسيتون Acetone (1- 4 جزء في المليون) والأسيتوين Acetoien (2.5 - 4 جزء في المليون) وثنائي الاسيتيل Diacetyl (0.4 - 13 جزء في المليون).

4- يحلل بادئ الزبادي البروتين بدرجة ضئيلة وتعمل الببتيدات والأحماض الأمينية المتكونة كمولدات للتفاعلات الأنزيمية والكيميائية التي تنتج مواد النكهة. ويرتبط تحلل البروتين بصورة رئيسية بالنوع *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*، ولكن الأنزيمات المحللة للببتيدات تنتج بواسطة بكتيريا *S. salivarius* subsp. *thermophilus* وقد ينتج طعم مر نتيجة تحلل الببتيدات إلى وحدات أصغر، ويعزى إنتاج المرارة (الطعم المر) لاستخدام درجة حرارة تحضين أقل من 38°م أو للنشاط الأنزيمي خلال التخزين المبرد. ويتراوح محتوى الزبادي من الأحماض الأمينية الحرة بين 33.6 – 70 مجم/100مل.

5- قد يحدث بعض التحلل لدهن الحليب بفعل بكتيريا البادئ، وتسهم النواتج النهائية للتحلل الدهني بدرجة مهمة في نكهة الزبادي. ويكون أنزيم اللايبيز Lipase من بكتيريا بادئ الزبادي نشيطا خاصة في تحليل الجليسريدات الثلاثية القصيرة السلسلة.

6- تكون هناك زيادة في النياسين وحامض الفوليك خلال التخمر، ولكن يقل مستوى فيتامين B_{12} الثيامين، الريبوفلافين وحامض البنتوثونيك.

7 - هناك نواتج تمثيل أُخرى لها نشاط مثبط للبكتيريا Antimicrobial agents تنتجها سلالات متعددة من بكتيريا البادئ وهذه المواد عبارة عن مضادات حيوية أو مواد شبيهة بالمضادات الحيوية Antibiotic like substances، فقد أمكن فصل مضاد حيوي من بكتيريا *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* سُمي Bulgarican كما فصل مضاد حيوي ذو وزن جزئي صغير من الحليب المتخمر ببكتيريا *S. salivarius* subsp. *thermophilus* وقد وجد أن له أثر مضاد لسلالات *Bacillus*، *Shigella*، *Salmonella*، *Pseudomonas*، و *Escherichia coli*. كما وجد أن بكتيريا *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* تنتج فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2.

ثالثا:- الألبان المتخمرة المنتجة بالبادئات الصحية أو العلاجية Therapeutic Cultures:

حليب الأسيدوفلس Acidophilus milk:

يعتبر هذا الحليب من أشهر الألبان المتخمرة التي تصنع في العديد من الدول المتقدمة، وهو من الألبان المتخمرة الصحية (العلاجية)، وترجع هذه التسمية لهذا المنتج إلى استعمال بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* في تحضيره.

وعلى العكس من بكتيريا *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* التي لا تستوطن الأمعاء، نجد أن بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* تتواجد بأعداد كبيرة في أمعاء الأطفال ثم تختفي عند الفطام. وقد كان من المعروف منذ زمن طويل أن هذه البكتيريا يمكن توطينها في أمعاء الأشخاص البالغين، حيث أن وجودها في الأمعاء مفيد في حالات الإمساك والإسهال وبعض الاضطرابات المعوية المماثلة. وعلى ضوء هذه المعلومات فانه يتم حاليا توزيع كميات كبيرة من هذا النوع من الألبان المتخمرة على المستشفيات في الولايات المتحدة لعلاج المرضى خصوصا الذين يتعاطون المضادات الحيوية، حيث أنه من المعروف أن هذه المضادات الحيوية تقضي على البكتيريا الطبيعية للأمعاء فتسمح بذلك بنمو بعض الخمائر والفطريات الضارة، ويمكن تجنب ذلك إذا تناول المريض حليب الأسيدوفلس وبذلك تسود بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* في الأمعاء فتمنع هذه التأثيرات غير المرغوبة لتناول المضادات الحيوية.

وتتميز بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* بأنها لا توجد طبيعياً في الحليب ولكنها تستطيع النمو فيه شرط عدم وجود منافسة لها من الأنواع الأُخرى ، لذا يجب أن يكون الحليب المستخدم في صناعة حليب الأسيدوفلس محمي من التلوث بقدر الإمكان، كما يجب أن تكون مزرعة البادئ محفوظة بصورة نشيطة ، كما يفضل نقل المزرعة الأم يوميا للتأكد من الحصول على نتائج ثابتة. ويعتبر الحليب الفرز المعقم البيئة الاعتيادية، فبعد تبريده إلى درجة 37°م، يلقح بمقدار 1 % من المزرعة النشيطة. بعد ذلك يتم تحضين الحليب الملقح بالبادئ حتى تصل حموضته إلى ما بين 0.6 – 0.7 % للحفاظ على أقصى درجة من نشاط الخلايا، وهذه المزرعة يمكن استخدامها فيما بعد لإنتاج البادئ بكميات كبيرة. ويتم تداول هذه المزرعة بالطريقة نفسها على أن يضاف البادئ بنسبة 2 – 5 % للحليب المستخدم.

يستخدم حليب فرز أو حليب كامل الدهن لإنتاج حليب الأسيدوفلس، ويجب أن يكون ذا جودة ميكروبيولوجية عالية، إضافة إلى أنه يجب معاملته حراريا للحصول على تعقيم شبه كامل، حيث يسخن الحليب عادة لحوالي 95°م لمدة ساعة ، ثم يبرد إلى 37°م، ثم يحفظ الحليب على هذه الدرجة لمدة 3 - 4 ساعات لتشجيع نمو البكتيريا المتجرثمة، ثم يسخن مرة أخرى إلى 90 - 95°م

لقتل أي خلايا خضرية أخرى، ثم يبرد إلى 37°م و يلقح الحليب المبرد ببادئ نقي من بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* ويحضن حتى تتكون الخثرة. وفي بعض المناطق قد تستمر عملية التخمر حتى الحصول على حموضة تصل إلى حوالي 1 % حامض لاكتيك قبل تبريده تعبئته، وفي حالة إنتاجه للاستعمال الطبي يجب وقف التخمر عند وصول الحموضة إلى ما بين 0.6 – 0.7 % حامض لاكتيك، وذلك بسبب أن البكتيريا تعيش أفضل على الحموضة المنخفضة، ولأن الخلايا الحية ضرورية لأي استخدام علاجي (الرقم الأمثل حوالي 200 - 300 × 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة/مل) لذا فإن خواص المنتج تضبط على هذا الأساس. وفي كلتا الحالتين يجب أن يتم تخزين عبوات المنتج بين 5 - 10°م. لكن ينبغي الإشارة إلى أن فترة حفظ المنتج على هذه الدرجة تبلغ حوالي أسبوع واحد فقط، مع إن إطالة فترة الحفظ عن ذلك ولو أنها لا تؤثر على حيوية البكتيريا إلا أنها سوف تقلل من قدرته على الاستيطان بالأمعاء. كما أن المحاولات لانتخاب سلالات قوية تتمكن من البقاء لفترة أطول لم تحقق إلا القليل من النجاح حتى الآن.

حليب البفيدُس Bifidus Milk

يصنع باستخدام بكتيريا *Bifidobacterium bifidum* وأحياناً *B. longum* وهو ينتج بكمية صغيرة في بعض الدول الأوروبية ويستخدم للأغراض العلاجية أكثر من استخدامه كلبن متخمر. ويصنع من الحليب الفرز أو الكامل وسلالات البادئ المستخدمة في تصنيعه معزولة من الإنسان (من أشخاص أصحاء) وهى تنمو ببطء في الحليب وتنتج حامض الخليك واللاكتيك من نوع (+) L بنسبة 3 : 2 تقريباً وتتكون نسبة بسيطة من كل من حامض الفورميك، حامض السكسنيك والكحول الإيثيلي. ويمكن تحسين نمو هذه السلالات وتحسين إنتاجها للحامض عن طريق إما زيادة كمية اللقاح أو بعض الإضافات إلى الحليب مثل مستخلص الخميرة أو بروتينات الشرش. ويتم تنشيط المزرعة الأم كل 2 - 3 أيام وذلك للتأكد من نشاط البكتيريا. ويتم تحضير حليب البفيدُس عن طريق تعديل نسبة الدهن في الحليب إلى النسبة المطلوبة، وزيادة نسبة البروتين في الحليب إما عن طريق التبخير أو عن الترشيح الفائق أو إضافة حليب فرز مجفف. ثم تُجرى عملية التجنيس والمعاملة بالحرارية للحليب على درجة حرارة تتراوح بين 80 - 120°م لمدة زمنية تتراوح بين 5 - 30 دقيقة، ثم يتم تبريد الحليب ويلقح بحوالي 10 % من مزرعة البادئ على درجة حرارة تتراوح بين 37 - 42°م حتى يتم التخثر، بعدها تتم عملية تعبئة المنتج وتحفظ العبوات مبردة بعد ذلك وحتى يتم التوزيع والاستهلاك.

وحليب البفيدُس الناتج يكون الـ pH له يتراوح بين 4.3 – 4.7 ويحتوي على 10^8 – 10^9 وحدة مكونة للمستعمرة/مل. وخلال فترة التبريد والتي تتراوح من 1- 2 أسبوع فإن عدد الخلايا يتناقص ليصبح في حدود 10^6 – 10^7 خلية بكتيرية/مل. وهذا النوع من الألبان

المتخمرة يكون أسهل هضماً من الحليب الذي صنع منه وهو يستخدم في علاج الاضطرابات المعدية المعوية Gastrointestinal disorders كما أنه يستخدم في إعادة توازن الميكروفلورا الطبيعية بعد العلاج بالمضادات الحيوية. ونظراً للإنتاج المنخفض للحموضة بواسطة بكتيريا *Bifidobacterium* فإن بعض المنتجين يستخدمون أنواع أُخرى من بكتيريا حامض اللاكتيك مثل *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* للإسراع بتكون الحموضة وممكن أن تضاف الفاكهة أيضاً لإكسابه بعض النكهة والطعم المرغوبين.

منتجات أُخرى Other Products:

هناك منتجات لبنية متخمرة أُخرى (غير حليب الأسيدوفلس Acidophilus milk وحليب البفيدُس Bifidus Milk) كثيرة ومنتشرة في كثير من دول العالم وجميع هذه المنتجات تندرج تحت المنتجات اللبنية المتخمرة الخاصة (الصحية أو العلاجية)، فهناك حليب البفيدُس – أسيدوفلس المعرف في الدنمارك باسم Cultura والذي يجمع بين المنتجين المذكورين أعلاه وهناك حليب البفيدُس – ثرموفيلس الذي ذكرنا أن كثير من المنتجين يعمدون إلى إضافة بكتيريا *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* من أجل رفع نسبة الحموضة في حليب البفيدُس وهذا المنتج معروف في ألمانيا باسم Bifighurt، إضافةً إلى حليب البفيدُس – أسيدوفلس – ثرموفيلس الذي يستخدم بادئ يحتوي على *Lactobacillus acidophilus* و *Bifidobacterium bifidum* و *S. salivarius* subsp. *thermophilus* وهذا المنتج يعرف باسم (ABT) والبادئ المحتوي على هذه الأنواع من البكتيريا يدعى (Biograde culture)، وهناك أيضاً حليب البفيدُس – أسيدوفلس – بديوكوكس الذي يستخدم بادئ يحتوي على كلٍ من *Bifidobacterium bifidum* و *Lactobacillus acidophilus* المعزولتين من أمعاء الإنسان بالإضافةً إلى بكتيريا *Pediococcus acidilactic* التي تضاف للمساعدة على تكوين الحموضة المرغوبة في هذا المنتج الذي يعرف في بعض الدول مثل سلوفاكيا وجمهورية التشيك باسم Biokys. وهناك منتجات لبنية متخمرة خاصة أُخرى مثل منتج (BRT) الذي يصنع من بادئ يحتوي على بكتيريا *Bifidobacterium infantis* و *Lactobacillus reuteri* و *L. acidophilus*.كذلك هناك منتج زبادي البفيدُس وفي هذا المنتج يتم إضافة بكتيريا *Bifidobacterium bifidum* مع مزرعة بادئ الزبادي المعروفة إلى الحليب المعد لتصنيع هذا المنتج، أيضاً هناك منتج زبادي البفيدُس – أسيدوفلس والذي يزيد عن سابقه بإضافة بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* وهذا المنتج يعرف في فرنسا باسم Ofilus.

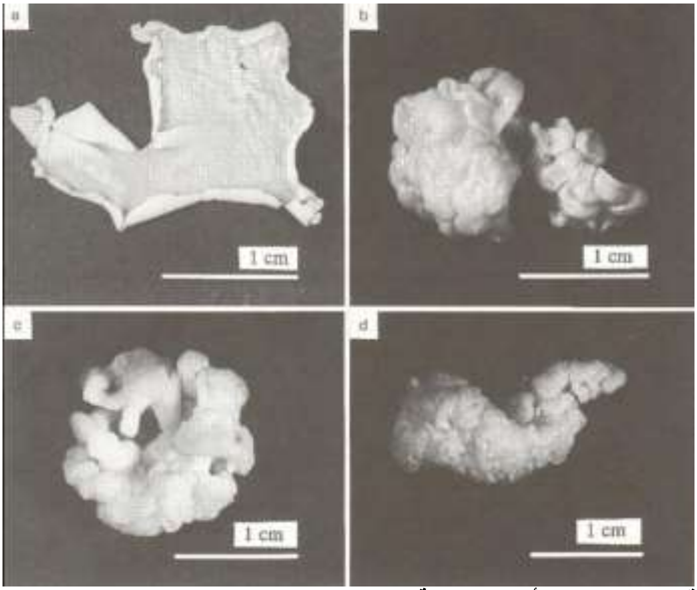
رابعاً:- الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والخمائر:

الكيفير Kefir:

يعتبر الكيفير Kefir من منتجات الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئ يحتوي على بكتريا حامض اللاكتيك لإنتاج الحموضة وخمائر لإنتاج الكحول، والكيفير Kefir منشئه شمال القوقاز، وهو عبارة عن سائل فوار effervescent كثيف القوام يصنع من حليب مبستر مضاف إليه بادئ الكيفير المحضر من حبوب الكيفير Kefir grains وهذه الحبيبات مواد بروتينية تحتوي على أحياء مجهرية وبشكل أساسي بكتيريا حامض اللاكتيك ومن ضمنها بكتيريا النكهة وبكتريا حامض الخليك وخمائر منتجة للكحول.

وحبوب الكيفير تتميز بشكل غير منتظم ذات لون ابيض يميل للاصفرار وقوام مطاطي ويتراوح قطر حبوب الكيفير بين 1 - 2 إلى 3 - 6 مليمترات، وأكثر حبوب الكيفير المنشطة تطفو على سطح الحليب وتنشأ حبوب الكيفير من علاقة تعاونية Symbiotic قوية ومحددة بين الأحياء المجهرية الموجودة فيها. وغالبا تحتفظ حبوب الكيفير بشكلها المحدد وتنمو وتتكاثر ناقلة خواصها إلى الجيل الثاني أو الحبوب الجديدة. وبالرغم من المحاولات المختلفة للحصول على حبوب الكيفير بتنمية مكوناتها معا إلا أن أياً من هذه المحاولات لم تنجح، ومن الناحية العملية فان حبوب الكيفير الجديدة تنشأ من انقسام الحبوب القديمة. ويظهر الفحص بالمجهر الإليكتروني أن حبوب الكيفير مكونه من خيوط منسوجة بصورة متداخلة مكونة التركيب البنائي الأساسي لهذه الحبوب وبداخلها تحتجز الأحياء المجهرية. والأحياء المجهرية المكونة لحبوب الكيفير هي بكتيريا حامض اللاكتيك وبكتيريا حامض الخليك والخمائر، وهذه الأحياء المجهرية موزعة في طبقات داخل حبة الكيفير، وقد وجد أن الجزء الوسطى من الحبة يحتوى على خمائر ليست لها القدرة على تخمير اللاكتوز بينما تتواجد الخمائر التي لها القدرة على تخمير اللاكتوز في الطبقات السطحية من الحبة بجانب بكتيريا حامض اللاكتيك وبكتيريا حامض الخليك.

وتشكل بكتيريا حامض اللاكتيك الجزء الأكثر فاعلية من مكونات بادئ الكيفير وتنتج حموضة سريعة في بداية التخمر إلى أن يتم تثبيط نشاطها نتيجة ارتفاع الحموضة الناتجة عن التخمر، بينما تلعب الخمائر دوراً مهماً في التعاون بين مختلف الأحياء المجهرية، كما تلعب دوراً مهماً في إنتاج غاز CO_2 والكحول وإظهار الطعم والنكهة المميزين لهذا المنتج، كذلك تلعب بكتيريا حامض الخليك دوراً مهماً في ثبات التعاون في حبوب الكيفير، بالإضافة إلى أهميتها في إظهار القوام وزيادة لزوجة المنتج علاوة على إنتاجها لحامض الخليك. والشكل التالي يوضح صورة بالمجهر الإليكتروني لحبوب الكيفير يظهر فيها عدد من الأحياء المجهرية الموجودة فيها من خمائر وبكتيريا كروية وعصوية الشكل.



الشكل رقم (238) يوضح أشكال مختلفة لحبوب الكفيير Kefir grains، عن (Law, 1997).

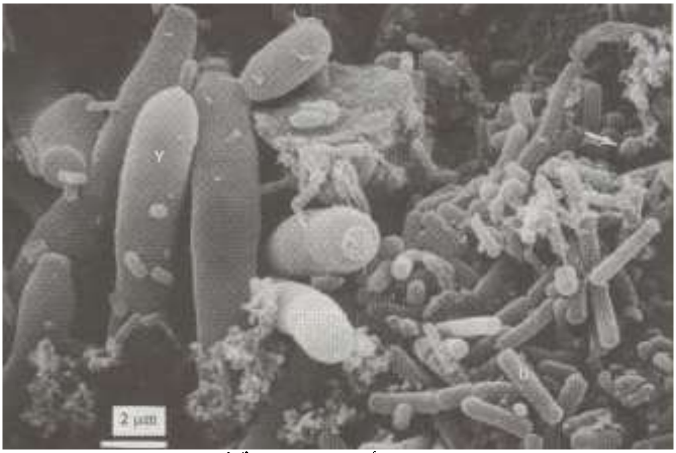
وتشكل بكتيريا حامض اللاكتيك الجزء الأكثر فاعلية من مكونات بادئ الكفيير وتنتج حموضة سريعة في بداية التخمر إلى أن يتم تثبيط نشاطها نتيجة ارتفاع الحموضة الناتجة عن التخمر، بينما تلعب الخمائر دوراً مهماً في التعاون بين مختلف الأحياء المجهرية، كما تلعب دوراً مهماً في إنتاج ثاني أكسيد الكربون CO_2 والكحول وإظهار الطعم والنكهة المميزين لهذا المنتج، كذلك تلعب بكتيريا حامض الخليك دوراً مهماً في ثبات التعاون في حبوب الكفيير، بالإضافة إلى أهميتها في إظهار القوام وزيادة لزوجة المنتج علاوة على إنتاجها لحامض الخليك. والشكل التالي يوضح صورة بالمجهر الإليكتروني لحبوب الكيفير يظهر فيها عدد من الأحياء المجهرية الموجودة فيها من خمائر وبكتيريا كروية وعصوية الشكل.

وتشكل بكتيريا حامض اللاكتيك الجزء الأكثر فاعلية من مكونات بادئ الكفيير وتنتج حموضة سريعة في بداية التخمر إلى أن يتم تثبيط نشاطها نتيجة ارتفاع الحموضة الناتجة عن التخمر، بينما تلعب الخمائر دوراً مهماً في التعاون بين مختلف الأحياء المجهرية، كما تلعب دوراً مهماً في إنتاج ثاني أكسيد الكربون CO_2 والكحول وإظهار الطعم والنكهة المميزين لهذا المنتج، كذلك تلعب بكتيريا حامض الخليك دوراً مهماً في ثبات التعاون في حبوب الكفيير، بالإضافة إلى أهميتها في إظهار القوام وزيادة لزوجة المنتج علاوة على إنتاجها لحامض الخليك. والشكل رقم (202) يوضح صورة بالمجهر الإليكتروني لحبوب الكيفير يظهر فيها عدد من الأحياء المجهرية الموجودة فيها من خمائر وبكتيريا كروية وعصوية الشكل.

جدول رقم (44) يوضح أنواع الأحياء المجهرية التي تم عزلها من حبوب الكيفير*.

<u>بكتيريا حامض اللاكتيك</u>	<u>الخمائرYeasts</u>
Lactobacillus kefir	***Candida friedrichii***
Lactobacillus brevis	***Candida holmii***
Lactobacillus acidophilus	***Candida kefyr***
Lactobacillus cellobiosus	***Candida pseudotropicalis***
Lactobacillus helveticus	***Candida tefluis***
L. delbreuckii* subsp. *Bulgaricus	***Candida valida***
L. paracasei* subsp. *Paracasei	***Cryptococcus kefyr***
L. paracasei* subsp. *Tolerans	***Kluyveromyces marxianus* var. *lactis***
L. paracasei* subsp. *pseudoplantarium	***K. marxianus var. fragilis***
L. paracasei* subsp. *Alactosus	***K. marxianus var. marxianus***
Lactobacillus rhamnosus	***Mycotorula kefyr***
Lactobacillus kejlranofaciens	***Mycotorula lactis***
Lactobacillus kefirgranum	***Mycotorula lactose***
Lactobacillus parakefir	***Pichia fermentans***
Lactobacillus viridescens	***Saccharomyces cerevisiae***
Lactobacillus fermentum	***Saccharomyces dairensis***
Lactobacillus gasseri	***Saccharomyces exiguous***
Lactobacillus plantarum	***Saccharomyces unisprous***
Lactococcus lactis* subsp. *lactis	***Thrulaspora delbrueckii***
Lac. lactis* subsp. *Cremoris	***Torulaspora delbreuckii***
Lac. lactis* biovar. *Diacetylactis	***Torulopsis holmii***
Leu. mesenteriodes* subsp. *dextranicum	***Torulopsis kefyr***
S. salivarius subsp. thermophilus	***Zygosaccharomyces florentinus***
<u>**بكتيريا أخرىContaminants**</u>	<u>**بكتيريا حامض الخليك**</u>
Pediococcus spp.	***Acetobacter aceti***
Micrococcus spp.	***Acetobacter rasens***
Bacillus spp.	
Escherichia coli	
Enterococcus durans	

*المصدر (Law, 1997).



الشكل رقم (239) صور بالمجهر الإليكتروني للأحياء المجهرية في حبوب الكيفير، عن (Law, 1997).

ويفسر التركيب المعقد لحبوب الكيفير صعوبة الحصول على بادئ ذي تركيب أمثل موحد وثابت. فمن الطبيعي إن أي حيود عن الظروف الموضوعة لتنمية حبوب الكيفير سوف يؤدى إلى اختلال التوازن الميكروبي وتركيب البادئ مما ينعكس أثره على التغيرات التي تحدث في المنتج. لكن إذا اتبعت نفس الظروف المستخدمة في كل مرة فان تركيب حبوب الكيفير سيظل ثابتا وهذا يثبت أن لحبوب الكيفير خاصية فريدة وهى قدرتها على التنظيم الذاتي لتركيبها وهو عامل مهم للإنتاج الصناعي للكيفير.

ومن أهم الصفات المميزة لبادئ الكيفير:

1- لا يتأثر نشاط البادئ بالتغيرات الموسمية في تركيب الحليب أو بوجود النسب الطبيعية (الموجودة عادة) من المضادات الحيوية، كما أنه مقاوم للبكتريوفاج.

2- إن أي محاولة لاستبدال حبوب الكيفير ببادئ مكون من مزارع نقيه من الأحياء المجهرية غير فعال نظراً لتغير النسب بين المكونات الميكروبية المختلفة مع عمليات إعادة الزرع.

3- يمكن المحافظة على نشاط حبوب الكيفير لسنوات متعددة إذا ما نميت تحت الظروف اللائمة لنموها. كما يمكن تجفيد حبوب الكيفير في بيئة مناسبة ويمكنها استعادة نشاطها عند تنميتها في الحليب المبستر.

ويمكن أن تحفظ حبوب الكيفير بصورة مجففة في مكان بارد وجاف لمنع فعاليات الأحياء المجهرية المكونة للبادئ وعند الظروف الملائمة يعاد تنشيط البادئ من جديد ويمكن حفظ البادئ المجفف لمدة تزيد عن 6 أشهر. وعند تحضير البادئ توضع الحبوب في ماء بدرجة حرارة 25 - 30°م لمدة 24 ساعة مع تبديل الماء ثلاثة مرات، بعدها ينقل إلى حليب فرز مبستر بنسبة (10:1) جزء حبوب : حليب، ويتم تنشيط البادئ بمزج الخليط بين فترة وأُخرى لتهوية الحليب وزيادة فعاليات الأحياء المجهرية ويمكن معرفة إعادة نشاط البادئ من صعود حبوب الكيفير إلى سطح الحليب ويرشح الحليب بواسطة مرشحات ثم تضاف الحبوب إلى حليب آخر لتحضير البادي ويستعمل الراشح كبادئ لإنتاج الكيفير.

إن حبوب الكيفير المستعملة لتحضير البادئ تزداد في الكمية بصورة تدريجية خلال الاستعمال ويمكن تجزئتها إلى أجزاء للحفظ بعد تجفيفها لاستعمالها لتحضير البادي التجاري. ولغرض تجفيف وحفظ الحبوب يجب غسلها بماء بارد سبق غليه، بعدها تجفف وتحفظ في عبوات مغلقة ومبردة وخلال الاستعمال يجب غسل الحبيبات بالماء بين فترة وأخرى لإزالة المواد اللزجة والحبوب التالفة لغرض المحافظة على الحبوب بحالة جيدة وصالحة للاستعمال. وعند استعمال حبوب الكيفير لمدة طويلة بدون عناية واهتمام وفي ظروف تخمر غير جيدة فان الكيفير يفقد خواص النكهة والطعم المميزين له ويكون المنتج مجرد حليب مختثر، وعند ذلك يجب تبديل حبوب

الكيفير واستعمال حبوب جديدة. ويمكن استعمال حبوب الكيفير لتحضير البادئ ل لفترات طويلة جداً إذا لم تتعرض للتلوث وحضرت بعناية وفي ظروف جيدة.

ويمكن أن تحفظ حبوب الكيفير بصورة مجففة في مكان بارد وجاف لمنع فعاليات الأحياء المجهرية المكونة للبادئ وعند الظروف الملائمة يعاد تنشيط البادئ من جديد ويمكن حفظ البادئ المجفف لمدة تزيد عن 6 أشهر. وعند تحضير البادئ توضع الحبوب في ماء بدرجة حرارة 25 - 30°م لمدة 24 ساعة مع تبديل الماء ثلاثة مرات، بعدها ينقل إلى حليب فرز مبستر بنسبة (10:1) جزء حبوب : حليب، ويتم تنشيط البادئ بمزج الخليط بين فترة وأخرى لتهوية الحليب وزيادة فعاليات الأحياء المجهرية ويمكن معرفة إعادة نشاط البادئ من صعود حبوب الكيفير إلى سطح الحليب ويرشح الحليب بواسطة مرشحات ثم تضاف الحبوب إلى حليب آخر لتحضير البادي ويستعمل الراشح كبادئ لإنتاج الكيفير.

حبوب الكيفير المستعملة لتحضير البادئ تزداد في الكمية بصورة تدريجية خلال الاستعمال ويمكن تجزئتها إلى أجزاء للحفظ بعد تجفيفها لاستعمالها لتحضير البادي التجاري. ولغرض تجفيف وحفظ الحبوب يجب غسلها بماء بارد سبق غليه، بعدها تجفف وتحفظ في عبوات مغلقة ومبردة وخلال الاستعمال يجب غسل الحبيبات بالماء بين فترة وأخرى لإزالة المواد اللزجة والحبوب التالفة لغرض المحافظة على الحبوب بحالة جيدة وصالحة للاستعمال. وعند استعمال حبوب الكيفير لمدة طويلة بدون عناية واهتمام وفي ظروف تخمر غير جيدة فان الكيفير يفقد خواص النكهة والطعم المميزين له ويكون المنتج مجرد حليب مخثر، وعند ذلك يجب تبديل حبوب الكيفير واستعمال حبوب جديدة. ويمكن استعمال حبوب الكيفير لتحضير البادئ ل لفترات طويلة جداً إذا لم تتعرض للتلوث وحضرت بعناية وفي ظروف جيدة.

ولتحضير منتج الكيفير، يضاف البادي المحضر(الراشح بعد التصفية) إلى الحليب المراد تصنيعه إلى كيفير بنسبة 5 % ويحضن بدرجة حرارة 20 - 22°م لمدة تتراوح بين 14 – 16 ساعة، يتم بعدها تبريده لإتاحة الفرصة لتكوين الكحول اللازم وعادة يحفظ المنتج بدرجة حرارة 12 - 16°م لمدة 4 –6 ساعات لهذا الغرض بعدها يعبئ المنتج ويبرد إلى درجة حرارة 6 - 8°م، ويفضل غلق عبوات الكيفير بصورة جيدة للمحافظة على غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2 المتكون من فعاليات الخمائر وبكتريا النكهة، حيث أن وجود الغاز في الكيفير ضروري لإظهار المنتج بالمواصفات المطلوبة والنكهة المتميزة والقوام المتجانس. وتتراوح نسبة الحموضة للكيفير الجيد بين 0.90 – 1.20 % (مقدرة كحامض لاكتيك) ونسبة الكحول تصل إلى ما بين 0.6 - 1 %. ويمكن حفظ المنتج لمدة تتراوح بين 1 – 3 أيام في درجة الحرارة المشار إليها أعلاه.

الكوميس Koumiss:

هو مشروب لبنى متخمر يصنع من حليب الخيل في جنوب روسيا، وقد نشأ بين القبائل الرُحل في تلك البلاد والذين تتميز خيولهم بإنتاجها الوفير من الحليب، ويتم تخمر هذا المنتج بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك وتحديداً *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* علاوة على وجود بعض الخمائر المحللة لسكر اللاكتوز (وهي تكون كميات واضحة من الكحول نتيجة ارتفاع نسبة سكر اللاكتوز بحليب الخيل)، كما أن بادئ الكوميس يحتوي على خمائر أُخرى غير تلك المحللة لسكر اللاكتوز. وفترة تخمر الكوميس تتراوح بين 12 ساعة إلى عدة أيام، ففي حالة التخمر القصير فان الناتج تكون حموضته متوسطة، أما إذا طالت فترة التخمر فان الحموضة قد تصل إلى 1 % مع تكوين كمية من الكحول تتراوح بين 2 – 3 %، وهذا ما يجعله هو والكيفير من المشروبات المحرمة علينا كمسلمين (فقد ورد في السنن الكبرى للنسائي، أن عبيد الله بن سعيد بن معبد قال حدثنا يحيى يعني بن سعيد عن عبيد الله قال حدثنا عمرو بن شعيب عن أبيه عن جده عن النبي ﷺ قال ما أسكر كثيره فقليله حرام، وأن حميد بن مخلد قال حدثنا سعيد بن الحكم قال أنبأنا محمد بن جعفر قال حدثني الضحاك بن عثمان عن بكير بن عبد الله بن الأشج عن عامر بن سعد عن أبيه عن النبي ﷺ قال أنهاكم عن قليل ما أسكر كثيره، صدق رسول الله ﷺ).

خامساً:- الألبان المتخمرة المنتجة باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك والأعفان:

الفيلي Viili:

لبن متخمر فلندى يصنع باستخدام بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة وعفن *Geotrichum candidum*، ويمتاز بمذاق حامضي معتدل ذو نكهة عطرية مع نكهة فطرية خفيفة Aromatic and Musty flavor وطبيعة متماسكة يمكن تقطيعه بالملعقة بسهولة.

خلال عملية تصنيع الفيلي Viili يسخن الحليب إلى درجة حرارة 83°م لمدة 20 – 25 دقيقة بدون تجنيس ثم يبرد إلى درجة 20°م، ثم يضاف إليه كمية من البادئ بين 3 – 4 % مكون من *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* و *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* و *L. lactis* subsp. *diacetilactis* و *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* إضافة إلى عفن *Geotrichum candidum*. بعدها تتم عملية التعبئة للمنتج في العبوات التي يتم فيها تسويق المنتج كما يحدث في تصنيع الزبادي الثابت Set Yoghurt، حيث يحضن المنتج

في هذه العبوات عند درجة حرارة 18 – 20°م ولمدة 24 ساعة بعدها يتم التبريد إلى درجة حرارة 4°م، وخلال فترة التحضين تبلغ الحموضة 0.90 % وينمو عفن *Geotrichum candidum* في سطح المنتج المتخمر معطياً مظهر أشبه بالقطيفة لمنتج الفيلي Viili، كما يُكَون الدهن طبقة قشدية على سطح الفيلي مما يعطي هذا المنتج مظهراً فريداً حيث يتكون من طبقتين وهي الطبقة العلوية المخملية المكونة من طبقة القشدة وقطيفة العفن، إضافة إلى الطبقة السفلية المكونة من اللبن المتخمر المتجبن تجبن حامضي. وهناك نوع من الفيلي Viili محلى أو محلى ومطعم بالفاكهة يعرف باسم Marjaviili وفي هذا المنتج تكون هنالك طبقة ثالثة إضافة إلى طبقتي القشدة وقطيفة العفن، وطبقة اللبن المتخمر المتجبن هي طبقة الفاكهة التي تكون في قاع العبوة، وتعمل الطبقة العلوية المخملية المتكونة نتيجة نمو عفن *Geotrichum candidum* على منع نمو الأحياء المجهرية المسببة للفساد. ومن الملاحظ أن سلالات بكتيريا البادئ المستخدمة لها القدرة على إنتاج مواد عديدة السكريات Exopolysaccharide (EPS) مما يُكسب المنتج خواصه المميزة المتمثلة في طبيعة المتماسكة.

الفصل السادس عشر

ميكروبيولوجيا الجبن Cheese Microbiology

يعتبر الجبن احد الأغذية المعروفة منذ القدم، ويعرف بأنه المنتج المصنع من خثرة الحليب الكامل أو الفرز أو المفروز جزئياً أو حليب الخض أو من مزج بعض أو كل هذه المنتجات بإضافة القشدة أو عدم إضافتها، ويمكن أن يكون مصدر الحليب حليب الأبقار أو الجاموس أو الأغنام أو الماعز. وتنتج الخثرة المتحصل عليها من استعمال بعض الإنزيمات وبشكل خاص إنزيم الرنين أو الأحماض وبالأخص حامض اللاكتيك المنتج من قبل بعض أجناس وأنواع بكتريا البادئ.

وتمر بعض أنواع الجبن بفترة إنضاج محددة تحت ظروف حرارة ورطوبة معينة، ويقصد بإنضاج الجبن التغيرات التي تحدث في الصفات الكيميائية والفيزيائية للجبن أثناء تصنيعه وخزنه ومعاملته تحت ظروف معينة ابتداء من مرحلة ترسيب خثرة الجبن وانتهاء بمرحلة الخزن والتجهيز. وتشمل هذه التغيرات مواد النكهة والطعم إضافة إلى القوام والتركيب الكلى للجبن، حيث تتحلل البروتينات إلى مركبات ببتيدية وأحماض أمينية بسبب الأحماض أو الإنزيمات أو فعل الأحياء المجهرية المضافة أثناء الصناعة، أو تكوين الغازات داخل تركيب الجبن مسببة وجود بعض الفقاعات أو تكوين النكهة الخاصة للصنف المعين بسبب تحلل وتجزؤ بعض مكونات الخثرة بصورة عامة. ويمكن تلخيص خطوات تصنيع الجبن بما يلي:

1- تخثير الحليب باستعمال إنزيم الرنين وحامض اللاكتيك.

2- تقطيع الخثرة المتكونة وإزالة معظم الشرش.

3- تصنيع الخثرة شبه الصلبة تحت ظروف معينة.

وتؤثر العوامل التالية على الاختلافات الحاصلة في نوعية بعض أنواع الجبن الناتجة:

1- مصدر الحليب المستعمل (بقري جاموسي حليب أغنام أم ماعز).

2- درجة تطور الحموضة ونوعية البكتيريا المستعملة في الحصول على الحامض.

3- درجة حرارة إضافة المنفحة (إنزيم الرنين) ودرجة حرارة وطبخ الخثرة في الشرش.

4- طريقة تقطيع الخثرة وحجم مكعبات الخثرة الناتجة.

5- معاملات الخثرة بعد فصل الشرش منها.

6- طريقة فرم وتمليح الخثرة ونوع التعبئة المستعملة.

7- مستوى الضغط المستعمل في كبس الخثرة وتخليصها من الشرش.

8- زمن وحرارة ورطوبة فترة الإنضاج.

9- بعض المعاملات الخاصة لإنتاج شكل وسطح معين للجبن الناتج.

ويعتمد تركيب الجبن على نوع ومصدر الحليب وطريقة تصنيع الجبن، فحوالي 95 % من دهون وكازينات الحليب الكامل مع 50 % من المواد المعدنية تنتقل إلى الجبن من الحليب بين تُفقد بروتينات الشرش وسكر اللاكتوز ونسبة كبيرة من الأملاح والفيتامينات الذائبة في الماء مع الشرش (ماء الجبن).

هناك عدة طرق مختلفة لتصنيف أنواع الجبن لكن أكثرها انتشاراً وأهمها فائدة هي طريقة التصنيف التي تستند إلى تركيب الجبن من الناحية الفيزيائية أو الكيميائية أو الصفات الميكروبيولوجية. والأسس التي يعتمد عليها هذا التصنيف هي:

أ- نسبة الرطوبة في الجبن وتوجد تحت هذا النوع من التصنيف ثلاث مجاميع:

1- أنواع الجبن الطرية وتكون فيها نسبة الماء 40 % أو أكثر من أمثلتها الجبن الأبيض الطري.

2- أنواع الجبن شبه الجافة وتكون فيها نسبة الماء 36 - 40 % من أمثلتها جبن الجودا **Gouda**.

3- أنواع الجبن الجافة وتكون فيها نسبة الماء 25 - 36 % من أمثلتها جبن التشيدر **Cheddar**.

4- أنواع الجبن الجافة جداً ونسبة الماء أقل من 25 % من أمثلتها جبن البارميزان **Parmesan**.

ب- طريقة ودرجة الإنضاج وتصنف فيما أنواع الجبن استنادا إلى قوة نكهتها ونوع الأحياء المجهرية المستعملة في صناعتها:

1- أنواع الجبن قوية النكهة **Sharp cheeses**.

2- أنواع الجبن خفيفة النكهة **Mild cheeses**.

3- أنواع الجبن المنضجة باستعمال الأعفان **Mold-ripened cheeses**.

4- أنواع الجبن المنضجة باستعمال البكتيريا **Bacteria-ripened cheeses**.

وهناك بعض المواد المضافة إلى أنواع الجبن خلال عملية التصنيع، حيث يسمح اعتياديا بإضافة بعض المواد التي لا يقصد من إضافتها الاستعاضة عن أي من مكونات الحليب ويمكن حصر ذلك بما يلي:

1- البادئات وهي المزارع النقية لنوع واحد أو أكثر من البكتيريا، والتي تضاف أثناء صناعة الجبن لغرض إنتاج حامض اللاكتيك أو سبورات الأعفان التي تستعمل لإنبات الأعفان في بعض أنواع الجبن بهدف إنتاج الإنزيمات التي تساهم في عمليات الإنضاج وكذلك بعض الخمائر.

2- إنزيم الرنين أو بدائله والتي تستعمل لغرض تكوين خثرة الجبن.

3- الأحماض العضوية وغير العضوية وتستعمل لأغراض تطوير النكهة أو تكوين خثرة الجبن.

4- كلوريد الصوديوم (ملح الطعام) للمساهمة في إعطاء النكهة وتحديد نشاط الأحياء المجهرية المساهمة في عملية إنضاج الجبن.

5- كلوريد الكالسيوم الذي يضاف للتعويض عن الكالسيوم المفقود من الحليب أثناء المعاملات الحرارية المالية لإعطاء الخثرة الناتجة تماسك وقوة مناسبة.

6- أملاح نترات البوتاسيوم كمادة مؤكسدة تمنع نمو البكتيريا غير الهوائية كما تستعمل أملاح الكلورات أو الايودات أو البرومات أو الكلوريدات.

7- فوق أكسيد الهيدروجين H_2O_2، وذلك لعرقلة نمو البكتيريا بعد عملية الحلب مباشرة وإنتاج جبن عالي الطراوة.

8- مركب النيسين Nisin وهو مضاد حيوي معرقل لنمو البكتيريا الضارة في الحليب والتي تسبب حالات التسمم في الجبن وأهم استعمال له في صناعة الجبن المطبوخ.

9- صبغة الاناتو أو الكاروتين.

10- بعض مواد النكهة كالتوابل.

كما أن هناك بعض المواد التي مصدرها الحليب يمكن إضافتها خلال عليات تصنيع الجبن مثال ذلك الحليب الفرز المجفف الذي يضاف عادة لغرض تعديل نسبة الدهن خاصة عند استعمال مصادر الحليب الغنية بالدهن كحليب الأغنام والماعز والجاموس في صناعة الجبن، وقد يستعمل الحليب الفرز المجفف لوحده أحياناً في إنتاج أنواع الجبن الطرية أو الجافة. أما القشدة فتضاف إلى حليب الجبن لغرض زيادة نسبة الدهن لإنتاج أنواع معينة منه وهي الأنواع الغنية بالدهن. كما قد يضاف الشرش المجفف أحياناً لتحسين صفات الاحتفاظ بالرطوبة في الجبن أو لغرض تحسين صفات الإنضاج أو لزيادة كمية الجبن الناتج فضلاً عن إيجاد طرق أُخرى للتخلص من مشاكل التلوث البيئي من جراء رمي الشرش في المجاري.

تأثير إنزيم الرنين على الحليب:

إن الكازينات في الحليب تكون الجزء الرئيسي من بروتينات الحليب حيث تبلغ نسبتها حوالي 80 % من المجموع الكلي للبروتينات في الحليب. أما الباقي فهي عبارة عن بروتينات الشرش وتشمل لاكتالبيومين α-Lactalbumins ولاكتوجلوبيولين β-Lactoglobulins والبيومين المصل serum-albumin إضافة إلى كميات قليلة جدا من بروتينات أُخرى ، ومن المعروف أن الكازينات تتكون من مجموعة بروتينات أهمها (α s_1Casein و α s_2 Casein و β-Casein و κ- Casein). وتوجد هذه الكازينات متجمعة مع بعضها البعض من خلال أواصر فوسفات الكالسيوم والمغنيسيوم على هيئة جسيمات كازينية غروية تدعى micelle يتراوح قطر الجسيمة الواحدة بين 80 – 100 ملي ميكرون حيث أثبتت كثير من الدراسات وجود الكابا كازين κ- Casein على الطبقة الخارجية من الحبيبة الكازينية، وهذا ما ذكر بنوع من التفصيل سابقاً.

إن من أهم ما يتميز به الكابا كازين κ- Casein عن الكازينات الأُخرى ما يلي:

1- عمله الوقائي لمنع ترسيب بقية الكازينات بسبب وجود أملاح الكالسيوم في الحليب. فهو الذي يحافظ على الهيئة الغروية للكازينات في الحليب ويمنعها من الترسب في الظروف الطبيعية.

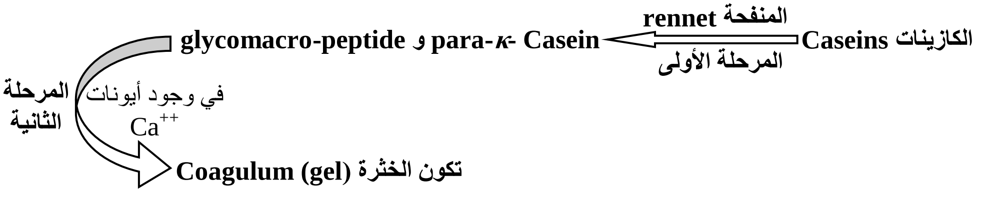
2- انه الكازين الوحيد الذي لا يترسب ولا يتأثر بتركيز الكالسيوم الطبيعي الموجود في الحليب خلافاً لصفات الكازينات الأُخرى التي سرعان ما تترسب بوجود الكالسيوم في حالة عدم وجود الجزء الدفاعي لها (الكابا كازين **κ- Casein**).

إن النظريات التي وضعت لتفسر فعل إنزيم الرنين علي كازينات الحليب كثيرة وقد تطورت بشكل سريع بعد اكتشاف الجزء غير الحساس للكالسيوم (الكابا كازين **κ- Casein**)، وحيث أثبتت الدراسات بد اكتشاف هذا الجزء من الكازين بأنه البروتين الوحيد الذي يتأثر بإنزيم الرنين خلال الوقت اللازم لتجبن الحليب بهذا الإنزيم وبحيث يفقد 20 % من وزنه الجزيئي أثناء تحلله. إن تأثير إنزيم الرنين على عملية تخثر الحليب تمر بمرحلتين هما:

1- <u>مرحلة التغيرات الكيميائية التي يسببها عمل هذا الإنزيم</u>، وتشمل هذه المرحلة تحلل جزيئه الكابا كازين بفعل إنزيم الرنين والذي يحلل الآصرة الببتيدية التي تربط الحامض الأمينيي فنيل اللانين **Phenylalanin** بالحامض الأمينيي **Methionin** والواقعة في الثلث الأخير من الجزيئية البروتينية (لاحظ الشكل رقم (204) الذي يوضح موقع الآصرة الببتيدية المستهدفة في الكابا كازين) مسببة شطر الجزيئية البروتينية إلى شطرين هما **para-κ- Casein** غير ذائب في وسط الحليب و **glycomacro-peptide** ذائب في الحليب. وبذلك تفقد الجزيئية البروتينية بعد تحلل خاصيتها في العمل الوقائي لمنع ترسب بقية الكازينات في وجود أملاح الكالسيوم وعندها تبدأ المرحلة الثانية.

2- <u>مرحلة حصول التجبن في الحليب</u>، يحدث ذلك نتيجة ترابط الجسيمات الكازينية مع بعضها البعض بسبب زوال وتحلل بروتين **κ- Casein** الواقي، وفي هذه المرحلة تتجمع الحبيبات الكازينية **micelle** بنظام معين وفي خطوات متتابعة لتكوين الخثرة ومن خلال الارتباط الذي يحصل نتيجة وجود ايونات الكالسيوم في الوسط ويزداد سمك هذه التجمعات في المركز حيث تتجمع الحبيبات الدهنية في وسطها لينتج عنها التجبن الكلي. ولذلك فان عدم وجود الكالسيوم أو انخفاض تركيزه لأي سبب كان يبطئ أو يوقف عملية التجبن في الحليب.

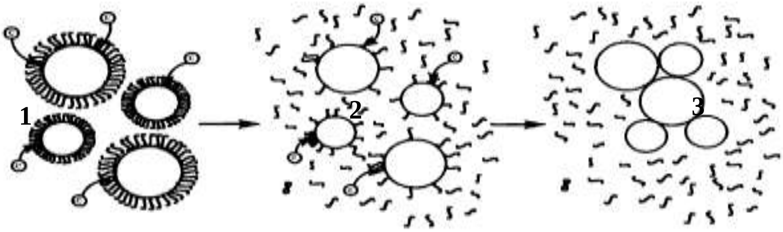
والمرحلتين السابقتين يمكن توضيحهما بالمخطط التالي:



الشكل رقم (240) يوضح مراحل تأثير إنزيم الرنين على عملية تخثر الحليب.

1
Pyro Glu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln-Pro-Ile-Arg-Cys-Glu-Lys-Asp-Glu-Arg-Phe-Phe-Ser-Asp-
21
Lys-Ile-Ala-Lys-Tyr-Ile-Pro-Ile-Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly-Leu-
41
Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro-Val-Ala-Leu-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Leu-Pro-Tyr-Pro-Tyr-
61
Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val-Arg-Ser-Pro-Ala-Gln-Ile-Leu-Gln-Trp-Gln-Val-Leu-Ser-
81
Asn-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser-Cys-Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met-Ala-Arg-His-Pro-His-
101 105↓106
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp-Lys-Thr-Glu-Ile-Pro-
121 Ile (Variant B)
Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-*Thr*- Ser-*Thr* -Pro-*Thr* - -Glu-Ala-Val-Glu-
Thr (Variant A)
141 Ala (Variant B)
Ser-*Thr* -Val-Ala-Thr-Leu-Glu- -*SerP* - Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-
Asp (Variant A)
161 169
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val.OH

الشكل رقم (241) يوضح تسلسل الأحماض الأمينية في جزيئة κ- Casein، وموقع الآصرة 105- 106 المستهدفة من إنزيم الرنين والواقعة بين الـ Phenylalanin و الـ Methionin، عن (Fox, *et al.* 2000).



الشكل رقم (242) جزيئات κ-Casein المحيطة بجسيمات الكازين. 1- في الحالة الطبيعية في الحليب، 2- في المرحلة الأولى لعمل إنزيم الرنين، 3- في مرحلة التجبن وتكون الخثرة، عن (Fox, *et al.* 2000).

ولن نخوض في تفاصيل عملية صناعة الجبن لكن بشكل عام يمكن أن نقول أنها عبارة عن خطوات متسلسلة على النحو التالي:

1- المعاملة الحرارية للحليب والتي ينبغي أن لا تؤثر على الكالسيوم بحيث تحوله من الحالة الأيونية إلى الحالة الغروية، وإذا حدث ذلك فينبغي تعويض الكالسيوم الأيوني المفقود.

2- إضافة البادئ للحليب المعد للصناعة بعد تبريد الحليب إلى درجة حرارة مناسبة لعمل البادئ.

3- إجراء عملية التجبن إما باستخدام الحامض أو بإضافة المنفحة (إنزيم الرنين) على درجة حرارة مناسبة وخلطها بشكل جيد مع الحليب والانتظار إلى حين اكتمال مرحلة التجبن وتكون الخثرة. والشكل رقم (231) يوضح أحد الأحواض المستخدمة في تصنيع الجبن، والمزودة بمقلبات ميكانيكية لعملية الخلط والمزج ويمكن أن يربط بسكاكين تقطيع وتقليب الخثرة.

4- تقطيع الخثرة باستخدام الأدوات المناسبة، والشكل رقم (232) يوضح بعض الأدوات المستخدمة في تقطيع وتقليب وتعبئة الخثرة. في حين يوضح الشكل (233) بعض الماكينات الحديثة المستخدمة في تصنيع الجبن، والتي تقوم بعمليات الخلط والمزج و تقطيع وتقليب الخثرة عن تصنيع الجبن بالطريقة المستمرة.

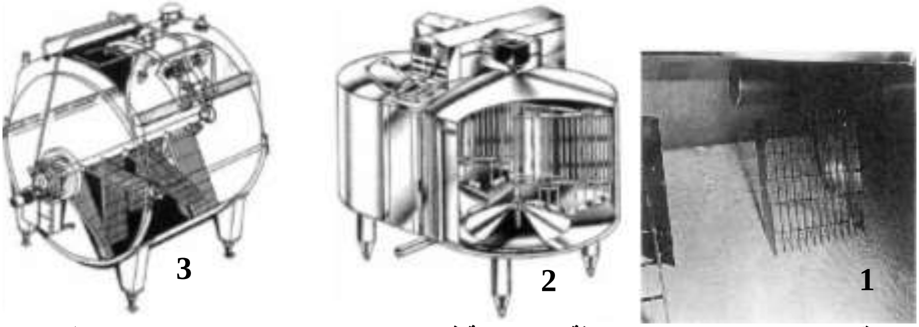
5- فصل وتصريف الشرش من الخثرة.

6- فرم وتمليح الخثرة ومن ثم تعبئتها وبعد ذلك تجرى عملية كبس الخثرة لتخليصها من ما تبقى بها من شرش.

7- عملية إنضاج الجبن مع مراعاة ضبط زمن وحرارة ورطوبة فترة الإنضاج.

الشكل رقم (243) يوضح حوض تصنيع الجبن، مزود بمقلبات ميكانيكية لعملية الخلط والمزج ويمكن أن يربط بسكاكين تقطيع وتقليب الخثرة، عن (Fox, *et al.* 2000).

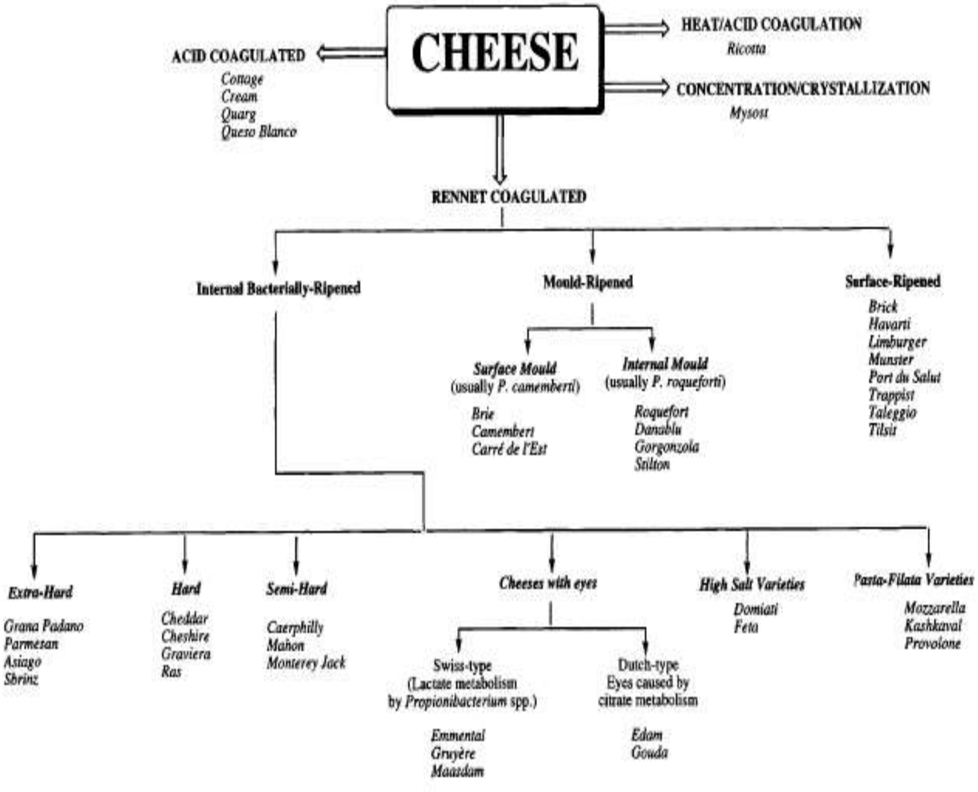
الشكل رقم (244) عملية تقطيع الخثرة، وكذلك بعض الأدوات المستخدمة في تقطيع وتقليب وتعبئة الخثرة.



الشكل رقم (245) بعض الماكينات الحديثة المستخدمة في تصنيع الجبن، والتي تقوم بعمليات الخلط والمزج و تقطيع وتقليب الخثرة عند تصنيع الجبن بالطريقة المستمرة. 1- صورة لعملية تقطيع وتقليب الخثرة، 2- خزان الخلط والمزج، 3- خزان تقطيع وتقليب الخثرة، عن (Fox, *et al.* 2000).

بادئات الجبن Cheese Starters:

إن إنتـاج الجبن يعتمـد علـى تخمـر سكر اللاكتـوز بواسـطة بكتيريـا البـادئ ليتكـون حـامض اللاكتيك بصورة رئيسة، وهذا يمنح الجبن نكهته الحمضية الخفيفة المرغوبة، ويساعد على عملية التخثر بواسطة المنفحة (إنزيم الرنين)، كما يؤدي ذلك إلى انكماش الخثرة وطرد الرطوبة منها، ويشجع على تكون القوام المميز للجبن خلال عملية تصنيعه. كما يساعد الـ pH المنخفض (والذي يصل إلى حوالي pH 5) المتكون نتيجة نشاط البادئ على وقف نمو البكتيريا الممرضة والبكتيريا المسببة للفساد مما يؤدي إلى إطالة فترة حفظ الجبن. وكما أشرت سابقاً عند تعرضنا لموضوع نشاط البادئات، أن بكتيريا حامض اللاكتيك تنتج أيضا كميات قليلة من مركبات النكهة المرغوبة، كما أن نشاطها في تحليل البروتين وبدرجة أقل في تحليل الدهون تساعد على إنضاج الجبن. إضافة إلى أن نمو بكتيريا حامض اللاكتيك يؤدي إلى خفض جهد الأكسدة والاختزال والذي يعتبر ضروريا لإنتاج مركبات الكبريت المختزلة مثل مركب ميثانثيول الذي يسهم في إظهار نكهة جبن التشيدر Cheddar.



الشكل رقم (246) يوضح بعض أصناف وأنواع الجبن بناءً على طريقة التجبن والإنضاج طرق التصنيع، عن (Fox, *et al.* 2000).

أنواع الجبن الطرية المنضجة بالبكتيريا Soft cheese ripened by bacteria:

تختلف هذه الأنواع من الجبن في مدة إنضاجها، فقد تكون المدة قصيرة لا تتجاوز بضعة أيام وقد تصل إلى بضعة أسابيع حسب نوع الجبن. وفي أنواع الجبن التي تنضج في فترات قصيرة مثل جبن Coloummier فتجرى تصفية الشرش من الخثرة تلقائيا بدون أي ضغط عليها لكي تحتفظ بداخلها بكمية ملموسة من الشرش الحاوي على كميات كبيرة من اللاكتوز، والذي يشجع على استمرار نمو بكتريا الـ *Lactococcus* المستخدمة كبادئ وتقوم بإنتاج الحموضة المطلوبة، كما أن استعمال درجات حرارة منخفضة لحفظ الحليب بعد إضافة المنفحة كما هو متبع في هذا النوع من الجبن يؤدي إلى إطالة الفترة اللازمة لإتمام التجبن والتي تسبق عملية تقطيع الخثرة مما يترتب عليه أيضاً تواجد أعداد كبيرة من بكتيريا *Leuconostoc* مما يودي إلى إنتاج مركبات النكهة المرغوبة.

أما بالنسبة لأنواع الجبن التي تنضج لفترات طويلة مثل جبن Limburger فأن عملية التسوية بها تستمر بعد إنتاج الحموضة وتبدأ من السطح الخارجي للجبن ثم تتجه للداخل تبعا لانتشار الإنزيمات البكتيرية. والمرحلة الأولى في تلك العملية تتضمن نمو خمائر Mycoderma المتحملة للملوحة على السطح مستهلكة حامض اللاكتيك في نموها مما يؤدي إلى انخفاض الحموضة مما يشجع نمو البكتيريا وخاصة تلك الحساسة للحموضة والمحللة للبروتين، والتي تكون مسئوله عن عمليات تصنيع هذا الصنف من الجبن.

أنواع الجبن الطرية المنضجة بالأعفان Soft cheese ripened by mold:

يعتبر جبن Camembert من الأمثلة الجيدة لأنواع الجبن التي تشترك في عملية إنضاجها كلٍ من البكتيريا والأعفان، فبعد ترشيح الخثرة ووضعها في القوالب تجرى عملية تمليح الخثرة بعد أن يلقح سطح الجبن بجراثيم (أسبورات) *Penicillium camemberti*، التي لا تتمكن من النمو بسبب ارتفاع نسبة الحموضة والملح. لكن وخلاك بضعة أيام تموت بكتيريا حامض اللاكتيك بعد أن تستهلك معظم اللاكتوز من البيئة، عندها تبدأ بعض الخمائر في النمو بعد ذلك مؤديةً إلى تصلب سطح الجبن كما أنها تستهلك أثناء نموها كميات من حامض اللاكتيك المتكون فتنخفض نسبته كما تنخفض أيضاً نسبة الملح في سطح الجبن نتيجة لتسربه إلى داخل الجبن، ونتيجة لهذه التغيرات تصبح الظروف مناسبة لإنبات جراثيم الفطر *P. camemberti*، مما يؤدي إلى تغير لون سطح الجبن من اللون الأبيض إلى اللون الرمادي الناتج عن جراثيم الفطر بعد اكتمال نموه. ويفرز الفطر *P. camemberti* إنزيمات خارجية تنفذ إلى داخل الجبن، وتتميز هذه الإنزيمات بقدرتها الفعالة على تحليل البروتين والدهن مما يكسب الجبن قواما ناعما وطعماً حادا قويا.

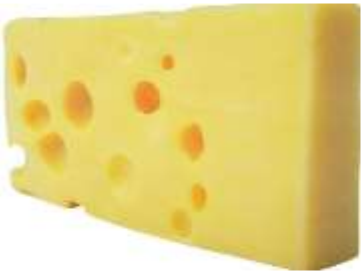
أنواع الجبن الجافة المنضجة بالبكتيريا Hard cheese ripened by bacteria:

تتميز صناعة الجبن الجاف بأنه يتم التخلص من جزء كبير من الشرش بالخثرة مما يؤدي إلى انخفاض نسبة الرطوبة بالناتج النهائي، ومن أهم الأمثلة عليها جبن التشيدر Cheddar الذي يصنع بإضافة بادئ يحتوى على بكتيريا *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* وبكتيريا *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* وبعد أن يتم التجبن تقطع الخثرة تقلب في وجود الشرش على درجة حرارة تتراوح بين 39 - 40°م لمدة تصل إلى 45 دقيقة، ويستمر التقليب حتى تصبح الخثرة صلبة بما فيه الكفاية، عندها تكون الحموضة وصلت إلى ما بين 0.15 – 0.19 %، يتم بعد ذلك تصفية الشرش من الخثرة وتترك لتتماسك وتقلب من وقت لآخر لتسهيل خروج الشرش ثم تكوم فوق بعضها وتعرف هذه العملية بالشدرنه Cheddaring، بعدها تقطع الخثرة وتملح وتعبئ في قوالب لكبسها لتشكيلها على هيئة أقراص تحفظ بعدها في غرفة الإنضاج.

ومن أنواع الجبن الجافة الشهيرة الأُخرى التي لابد أن نتطرق إليها، الجبن السويسري Swiss Cheese أو ما يعرف بجبن الإمنتال Emmental نسبة إلى المكان الذي عُرف منه. وهو عبارة عن جبن جاف يصنع باستعمال المنفحة ويتميز هذا الجبن بوجود فتحات في نسيجه تعرف بالعيون. وفي صناعة هذا النوع من الجبن يضاف البادئ الخاص بذلك يحتوي على ثلاثة أنواع من بكتيريا حامض اللاكتيك هي *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* وكذلك *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* و *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* التي تكون تلك الفتحات التي يشتهر بها هذا النوع من الجبن إضافةً إلى إسهامها في تطوير نكهة الجبن السويسري. وبعد إضافة البادئ تقطع الخثرة إلى قطع صغيرة ثم تسخن مع الشرش بصورة مستمرة مع التحريك المستمر لمدة ساعة وذلك للوصول إلى درجة حرارة 55°م وتكون حموضة الشرش في هذا الجبن بحدود 0.1 – 0.12 %، بعدها تنقل الخثرة من حوض التجبن إلى قطعة قماش موضوعة في قالب ثم تتم عملية كبس القوالب لإزالة الرطوبة الزائدة والمساعدة في تكوين قشرة سطحية موحدة.

ويجب أن لا تزيد حموضة الجبن كثيراً بحيث لا يقل الـ *pH* عن 5 لأن الحموضة المرتفعة تمنع نمو بكتيريا *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* مما يؤدي إلى قلة تكوين العيون الطبيعية. ينقل الجبن بعد ذلك إلى غرفة مبردة على درجة حرارة 11°م ويملح بوضعه في محلول ملحي مركز وكذلك رش أو فرك القالب بالملح لعدة أيام، وبعد الانتهاء من عملية التمليح ينقل الجبن إلى غرف الإنضاج حيث تكون درجة حرارتها حوالي 21°م ورطوبتها النسبية بين 80 – 85 %، وخلال فترة تتراوح بين 6 – 10 أيام يبدأ تكوين العيون،

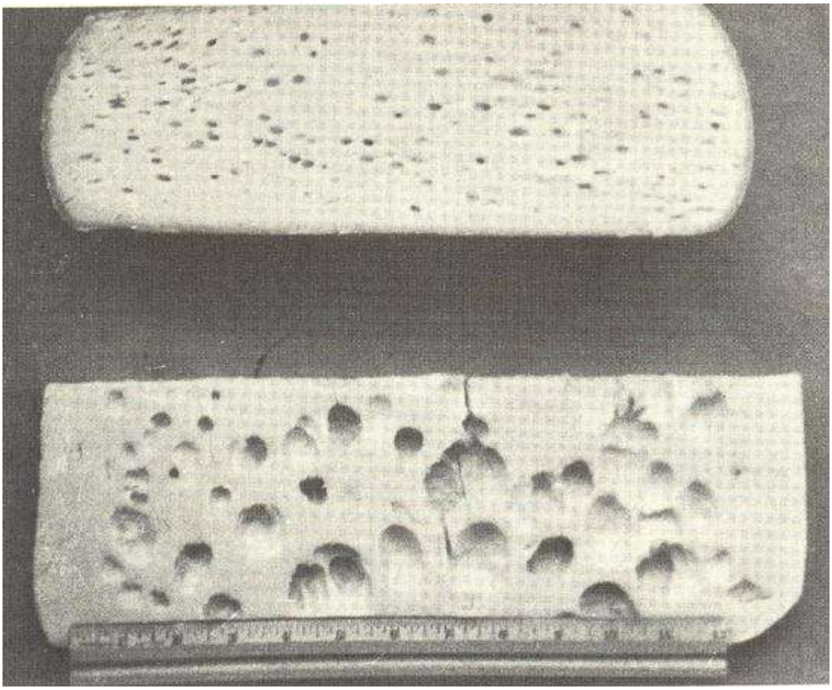
التي تتكون نتيجة تجمع غاز ثاني أكسيد الكربون حيث أن الغاز ينفذ خلال الجبن بحيث يتجمع في المناطق الضعيفة حيث تتكون العين.



الشكل رقم (247) يوضح العيون المتكونة في الجبن السويسري.

إن عدم تكوين الغاز الكافي يسبب عدم تكوين أو قلة في عدد العيون (وهكذا يقال على الجبن انه أعمى) أما إذا كان ضغط الغاز عالياً فانه يسبب إنتاج شقوق في الخثرة.

يستمر تطور النكهة الخاصة بالجبن لعدة أشهر بعد تكوين العيون، ويرافق تطور النكهة تجمع كميات قليلة من حامض البروبيونيك والخليك. ويرافق تطور الطعم الجيد لهذا الجبن تحرر الحامض الأميني البرولين **proline**، ويصبح الجبن أكثر طراوة مع تقدم وقت الإنضاج نتيجة عمل الإنزيمات المحللة للبروتين حيث يتحول حوالي ثلث النيتروجين الكلى إلى نيتروجين ذائب.



الشكل رقم (248) يوضح مشاكل في الجبن السويسري، في الأعلى تكوين غاز مبكر، وفي الأسفل تكوين غاز متأخر مع ظهور عيون كبيرة وتصدعات غير منتظمة، عن (Frazier and Westhoff, 1997).

أنواع الجبن شبة الجافة المنضجة بالأعفان Semi-soft cheese ripened by mold:

الأمثلة على هذا الأنواع من الجبن كثيرة فهناك جبن **Stilton** وجبن **Roquefort** وجبن **Gorgonzola** التي يستخدم الفطر ***Penicillium roqueforti*** في عملية إنضاجها حيث تترك الخثرة بعد التعبئة مفككة بدون كبس كما تثقب أقراص الجبن بإبر معدنية لشق قنوات هوائية تسمح للفطر(الذي يتميز بتحمله للتركيزات المنخفضة من الأوكسجين بجانب التركيزات العالية من ثاني أكسيد الكربون) بالنمو كما يتضح من الشكل رقم (249 A).

ويعتبر جبن **Roquefort** هو الأقدم والأكثر شهرة بين هذه المجموعة، وفي عملية تصنيعه يتم إضافة بادئ يحتوى على بكتيريا ***L. lactis* subsp. *lactis*** للحليب المعد لتصنيع الجبن، وبعد إضافة المنفحة وإتمام التجبن يتم تقطيع الخثرة وتصفية الشرش منها، بعدها تلقح بجراثيم (أسبورات) الفطر ***P. roqueforti***، وتعبئ الخثرة في قوالب بدون كبس ثم توضع على درجة حرارة 20°م، مع الحرص على تقليب هذه القوالب بين فترة وأخرى لتسهيل تصريف كميات إضافية من الشرش لضمان تماسك جزئيات الخثرة، وفي اليوم التالي تزال أقراص الجبن من القوالب وتملح بغمرها في محلول ملحي لمدة يومين، بعدها ترفع ويكمل تمليحها برش ملح جاف على سطح هذه القوالب لمدة عشرة أيام، مما يودي إلى جفاف السطح. بعد ذلك تشمع الأقراص وتعمل ثقوب بداخلها لتوفير الهواء اللازم لنمو الفطر كما هو موضح بالشكل أعلاه، ثم توضع في حجرة التسوية على درجة حرارة ما بين 9 - 12°م، ورطوبة نسبية قدرها 95 – 98 % لمدة ثلاثة أشهر، بعدها تنظف الأقراص وتغلف وتخزن على درجة حرارة لا تتجاوز7°م لعد أشهر إلى أن يكتسب الجبن صفات القوام والنكهة المرغوبة. وأثناء عملية إنضاج جبن **Roquefort** تحدث تغيرات ميكروبية متعددة. فيحدث تناقص تدريجي لإعداد بكتيريا ***L. lactis* subsp. *lactis*** والتي كانت في الأيام الأولى من إنتاجه تقدر بمئات الملايين في الجرام الواحد، وذلك نتيجة للحموضة العالية المتكونة والزيادة المستمرة في الملوحة مما يؤدي إلى تتلاشى هذه الأعداد تقريبا بعد أسبوعين من بدأ الإنتاج. أما نمو الفطر ***P. roqueforti*** فلا يظهر داخل الجبن إلا بعد حوالي أربعة أسابيع ويصل إلى أقصى مدى له بعد فترة تتراوح بين شهر إلى ثلاثة أشهر، ويلاحظ أن بداية النمو تكون في منطقة القنوات الهوائية ثم ينتشر خلال أجزاء الخثرة المفككة على هيئة عروق خضراء مزرقة اللون (لون الجراثيم التي ينتجها الفطر الناضج) لذلك يطلق على هذه الأنواع اسم أنواع الجبن ذات العروق الزرقاء **Blue-veined cheeses**، كما هو واضح في الشكل رقم (249 B). ويقوم الفطر ***P. roqueforti*** أثناء نموه بإفراز إنزيم البروتييز **Protease** وإنزيم اللايبيز **Lipase** اللذان يكسبان الجبن قواما ناعما نتيجة لتحلل الكازين وتحول نسبة كبيرة من البروتين إلى صورة ذائبة كما تتجمع مركبات النكهة مثل الأحماض

الأمينية و الأحماض الدهنية الطيارة وكيتونات الميثايل التي يكون مصدرها تحلل كل من البروتين والدهن بواسطة هذه الإنزيمات.

الشكل رقم (249) جبن Roquefort. (A) يوضح عملية ثقب أقراص الجبن بإبر معدنية لشق قنوات هوائية تسمح للفطر *P. roquefortii* بالنمو، (B) شكل المنتج النهائي بعد نمو الفطر وإتمام عملية الإنضاج.

التلف الميكروبي للجبن:

1- تكوين الغاز:

إن الغار غير المرغوب فيه يمكن أن يحدث في أي مرحلة من مراحل التصنيع أو التسوية، والوقت اللازم حتى يصبح الغاز المتكون ملحوظا يعتمد كثيراً على أعداد وأنواع الأحياء المجهرية المنتجة للغاز في الحليب الذي صنع منه الجبن. فمثلاً إذا تلوث الحليب بشدة ببكتيريا القولون إما بسبب عدم البسترة أو أنه تلوث بهذه الأحياء المجهرية بعد البسترة فان الغاز يصبح واضحا خلال طبخ أو تسخين الخثرة لدرجة تعمل على أن تطفو الخثرة بدلا من أن تغوص، وعادة يحدث إنتاج الغاز بشدة عند استعمال حليب ردي النوعية من ناحية صفاته الميكروبية. وكما هو معروف أن بكتيريا القولون تقاوم لحد ما حامض اللاكتيك المتكون وهي تستطيع تخمير سكر اللاكتوز بسرعة كما أنها تنمو جيداً على درجات الحرارة المستخدمة في عمل غالبية أنواع الجبن. وللتغلب على المشاكل التي تسببها بكتيريا القولون يجب استعمال حليب جيد النوعية من حيث صفاته الميكروبية كما يجب أن تتم عملية بسترته بشكل جيد. كذلك تستطيع الخمائر المخمرة لسكر اللاكتوز أن تسبب تكون الغاز في الجبن المصنوع مز حليب خام، كذلك فإن بعض أنواع البكتيريا مثل *Bacillus macerans* (*Paenibacillus macerans*) و *Bacillus polymyxa* (*Paenibacillus polymyxa*) تخمر سكر اللاكتوز إلى ثاني أكسيد الكربون والهيدروجين وحامض الخليك وإيثانول وكميات صغيرة من مواد أُخرى ، مما يؤدي إلى ظهور هذا العيب في أنواع الجبن المصنعة من حليب ملوث بهذه الأنواع من البكتيريا.

وأحياناً لا يمكن الكشف عن تكوّن الغاز في الجبن إلا بعد عدة أسابيع من تصنيعه (تكوين غاز متأخر) ويكون السبب عادة نشاط أنواع من بكتيريا *Clostridium* ومن أهم أنواع هذا الجنس التي تسبب ظهور هذا العيب *Clostridium pasteurianum* و *C. sporogenes* إضافةً إلى أنواع أُخرى كثيرة تابعة لنفس الجنس. وتكمن خطورة تكوّن الغاز المتأخر في أنها تعمل على إحداث ثقوب كبيرة الحجم فتتصل ببعضها وتصبح الخثرة كالإسفنج أو تصبح ذات شقوق واسعة، علاوة على تكوّن نكهات عفنة كريهة نتيجة نشاط تلك الأحياء المجهرية. وتوجد أفراد الجنس *Clostridium* بأعداد قليلة في كل عينات الحليب وهي كمجموعة ميكروبية تعتبر حساسة للحموضة والملح وغالبيتها يلزم لها درجة أعلى من تلك المستخدمة في الإنضاج، وهناك محاولات للتحكم في نموها باستعمال بادئات تحتوي على السلالات المنتجة للمضاد الحيوي النيسين Nisin والتابعة للنوع *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

2- التلوث بالأعفان:

يعتبر هذا العيب من أكبر المشاكل التي تواجه منتجي الجبن، فبالرغم من أن هناك أنواع معنية من الأعفان تستعمل لإنضاج بعض أصناف الجبن، فإن نمو الأعفان على غالبية الجبن يعتبر غير مرغوب فيه لأن جود مثل هذه الأحياء المجهرية يشوه منظر الجبن ويعطي نكهة عفنة.

وهناك الكثير من الأعفان التي تنمو على سطح قوالب الجبن أثناء عملية الإنضاج والتسوية. ومن أكثر الأنواع التي تنمو على الجبن أثناء تسويته تلك الأنواع التابعة للأجناس *Cladosporium* و *Penicillium* و *Aspergillus* و *Mucor* و *Alternaria* و*Monillia*. ولتجنب هذا العيب ينبغي الاهتمام بالشئون الصحية في صالات الإنتاج وغرف الإنضاج كخطوة أساسية للتحكم في نمو الأعفان في هذه الأماكن وضمان عدم تلوث الجبن المنتج بها.

3- القشرة الملوثة (المتعفنة):

إن تلوث (تعفن) قشرة الأنواع الجافة من الجبن ينشأ عن تجمع الرطوبة على سطح الجبن وبذلك يمكن أن تنمو طبقة رقيقة من الخمائر والأعفان والبكتيريا المحللة للبروتين وأحياء مجهرية أُخرى ، وتسبب هذه الأحياء المجهرية ليونة وطراوة في القشرة، كما تسبب تغيير اللون وظهور روائح غير مرغوبة. ويمكن أن نمنع ظهور هذه الحالة بحفظ سطح الجبن جافا بقدر الإمكان مع ضرورة التحكم في الرطوبة النسبية بغرف الإنضاج.

4- عيوب النكهة:

هناك كثير من النكهات والروائح غير المرغوبة في الجبن، فمنها رائحة العلف أو المرعى أو الحيوان أو الإسطبل، وهذه الروائح تنتج من استعمال حليب فيه مثل هذه العيوب، أما الروائح والنكهات الناتجة عن نشاط الأحياء المجهرية مثل عيب المرارة، فيعزى إلى العديد من الأحياء

المجهريـة المحللـة للبـروتين فـي الظـروف الحامضـية، وهنـاك مـن العيـوب المندرجـة تحـت هـذا الصنف، نكهة الخميرة التـي تنشـأ عن نمـو الخمـائر في الجبن في حين أن النكهـة المسمـاة نكهـة الفاكهة تنتج عن نشاط بعض الأحياء المجهرية والتـي منهـا بكتيريـا القولـون وبعض الخمـائر، أمـا الطعـم المتـزنخ فـي الجـبن فيسـببه نشـاط إنـزيم اللايبيـز الموجـود أصـلاً فـي الحليـب أو الأحيـاء المجهرية المحللة للدهون.

5- عيوب اللون:

عيوب اللـون كثيـرة فـي الجـبن، فكثيـراً مـا يحـدث تغيـر فـي لـون سـطح الجبن نتيجـة نمـو الأعفان، أما البقع اللونيـة في داخـل الجـبن فغيـر شـائعة بشـكل كبيـر، لكـن هنـاك بعـض الملاحظـات، مـثلا فـي جبن التشيدر **Cheddar** لـوحظ وجـود بقـع صـدئـة بسـبب نمـو بعض السـلالات المنتجـة للأصـــباغ مـــن أنـــواع جـــنس ***Lactobacillus*** وخصوصـــاً ***Lactobacillus brevis*** و ***Lactobacillus plantarum***، كذلك هناك أنواع من جنس ***Propionibacterium*** تسبب بقـع في الجبن السويسري.

الحدود الميكروبيولوجية للحليب ومنتجاته وفقاً للمواصفات القياسية اليمنية:

نورد هنا ما جاء في خصوص الحليب ومنتجاته ضمن المواصفة القياسية اليمنية والخاصة بالحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية والصادرة برقم (م. ق. ي 2002/384) التي سبق ذكر أجزاء منها في الفصول السابقة.

المواصفة القياسية اليمنية رقم 2002/384
الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية ـ الجزء الأول
(م. ق. ي 2002/384)

٣- الاشتراطات القياسية

١/٣ يجب أن تكون الحدود الميكروبيولوجية للأغذية والمكونات الغذائية كما هو موضح قرين كل منها بالجدول التالي:

٤- أحكام القبول والرفض

١/٤ تعتبر العينات غير مطابقة في الحالات التالية :

١/١/٤ إذا زادت قيمة الحد الميكروبي عن قيمة (ص) في وحدة أو أكثر من وحدات العينة (ع).

٢/١/٤ إذا كان عدد وحدات العينة المقبولة حدياً أعلى من قيمة (ق) المحددة في خطة التحليل.

٢/٤ يجري الاختبار على عينة واحدة. وإذا كان الحد الميكروبي ٨٠% من الحد الأقصى المسموح به يعاد الاختبار حسب العينات الموضحة بالمواصفة.

جدول رقم (45): الحدود الميكروبيولوجية للحليب ومنتجاته

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
حليب مبستر	Total Bacterial Count	5	1	3×10^4	10^5
	Coliform Count (MPN)	5	صفر	5	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
منتجات حليب متخمر الزبادي ـ اللبن ـ اللبنة	Coliform Count	5	1	10	10^5
	Molds and Yeasts	5	1	10^2	10^3
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
منتجات حليب متخمرة ومضاف لها نكهة	Coliform Count	5	1	10	10^2
	Molds and Yeasts	5	1	10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
حليب معامل بالحرارة الفائقة (UHT)	تحضين عند 30°م لمدة خمسة أيام (للمصانع الوطنية)				
	Total Bacterial Count(بعد التحضين)	5	صفر	10	-
	Coliform Count	5	صفر	صفر	-
حليب بالنكهة معامل بالحرارة الفائقة (UHT)	تحضين عند 30°م لمدة خمسة أيام (للمصانع الوطنية)				
	Total Bacterial Count (بعد التحضين)	5	صفر	10	-
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
	Coliform Count	5	صفر	صفر	-

تابع جدول رقم (45): الحدود الميكروبيولوجية للحليب ومنتجاته

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
حليب مكثف حليب مكثف محلي حليب مبخر	Total Bacterial Count	5	2	10^4	10^5
	Staphylococcus aureus	5	2	صفر	10
	- تحضين العبوات عند 30°م لمدة 28يوم، عند 44°م لمدة 10 أيام (للمصانع الوطنية) **يجب ألا يوجد أي نمو ميكروبي**				
قشدة مبسترة	Total Bacterial Count	5	1	5×10^4	10^5
	Coliform Count (MPN)	5	صفر	10	-
	Molds and Yeasts	5	1	20	10^2
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
قشدة مبسترة بالنكهة	Total Bacterial Count	5	1	3×10^4	10^5
	Coliform Count (MPN)	5	صفر	10	-
	Molds and Yeasts	5	1	20	10^2
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
قشدة مخفوقة	Total Bacterial Count	5	٢	5×10^4	5×10^5
	Coliform Count (MPN)	5	1	10	20
	Staphylococcus aureus	5	1	10	10^2
	Salmonella (٢٥ غم من العينة)	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
قشدة متخمرة	Coliform Count	5	1	10	20
	Staphylococcus aureus	5	1	10	10^2
	Molds and Yeasts	5	1	10	10^2
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
قشدة معقمة	**يطبق عليها متطلبات الأغذية المعلبة**				
مثلوجات غذائية (آيس كريم ـ مثلوجات حليبية ـ مثلوجات مائية)	Total Bacterial Count	5	1	5×10^4	10^5
	Coliform Count	5	1	10^2	10^3
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
	Staphylococcus aureus	5	1	10	10^2
	Salmonella (٢٥ غم من العينة)	10	صفر	صفر	-
مخاليط آيس كريم مجففة	Total Bacterial Count	5	2	3×10^4	3×10^5
	Coliform Count	5	1	10	10^2
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
جبن طري	*Escherichia coli*	5	2	10^2	10^3
	Staphylococcus aureus	5	2	10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
الأجبان الجافة والنصف جافة	*Staphylococcus aureus*	5	2	10^2	10^3
	Salmonella	5	صفر	صفر	-
	Coliform Count	5	2	10^2	10^3
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-

تابع جدول رقم (45): الحدود الميكروبيولوجية للحليب ومنتجاته

نوع المنتج	الميكروبات	الحدود / للمليلتر أو للغرام			
		ع	ق	م	ص
زبدة	Total Lipolytic & Proteolytic Bacterial Count	5	1	10^2	5×10^2
	Coliform Count	5	1	10	20
	Molds and Yeasts	5	1	10	10^2
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
جبن مطبوخ (معامل) غير المعبأ في عبوات معدنية	Total Bacterial Count	5	2	10^4	5×10^4
	Staphylococcus aureus	5	1	10	10^2
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
	Salmonella (٢٥ غم من العينة)	5	صفر	صفر	-
	Listeria monocytogenes	5	صفر	صفر	-
حليب مجفف كامل الدسم أو منزوع الدسم جزئياً أو كلياً، شرش مجفف أو مكثف	Total Bacterial Count	5	2	5×10^4	3×10^5
	Coliform Count	5	1	10	10^2
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
	Salmonella (٢٥ غم من العينة)	10	صفر	صفر	-
	Staphylococcus aureus	5	1	10	10^2
كازينات	Total Bacterial Count	5	2	3×10^4	2×10^5
	Coliform Count	5	1	10	10^2
	Staphylococcus aureus	5	صفر	صفر	-
	Salmonella	10	صفر	صفر	-
	Escherichia coli	5	صفر	صفر	-
سمن (من دهن الحليب)	Coliform Count	5	1	صفر	10
	Staphylococcus aureus	5	1	صفر	10

الفصل السابع عشر
الشئون الصحية في مصانع ومعامل الأغذية والألبان
Hygiene and Sanitation in Food & Dairy Industry

إن الشئون الصحية في مصانع ومعامل الأغذية والألبان والتي من أهم مفرداتها عمليات التنظيف والتطهير والتعقيم تعتبر جميعها من أهم العمليات التي يجب أن تُجرى بشكل دائم كخطوة مهمة من خطوات ضمان صحة وسلامة وجودة المنتجات في هذه المصانع والمعامل سواء كانت كبيرة أو صغيرة. ويمكن تعريف الشئون الصحية بأنها السيطرة المبرمجة والمنظمة على ظروف المحيط في مصانع ومعامل الأغذية والألبان، وكذلك في أماكن تخزين هذه المنتجات ووسائل نقلها.

ولتأمين فعالية هذه العملية يجب أن يتضمن برنامج هذه العملية ما يلي:

1- تنظيف الأجهزة والأدوات المستخدمة في الإنتاج أو النقل أو التداول للحليب ومنتجات الألبان تنظيفاً جيداً والتخلص من بقايا الحليب أو أيٍ من منتجات الألبان.

2- تطهير الأسطح التي هي على تماس مباشر مع الحليب أو منتجات الألبان الأُخرى .

3- السيطرة على الحشرات والقوارض التي من الممكن أن تتكاثر وتنتشر في هذه المرافق.

<u>ولنجاح برنامج الشئون الصحية ينبغي الاهتمام بما يلي:</u>

1- نشر التوعية الصحية والتعريف بأهمية الشئون الصحية وعمليات التنظيف والتطهير والتعقيم في أوساط العمال والمشتغلين في هذه المرافق، ويعتبر هذا العامل من أهم العوامل حيث أن ذلك العمل يجعل الجميع (من أعلى سلطة إدارية إلى أبسط العمال) شركاء في تحقيق النجاح لهذا البرنامج حيث أن الجميع مسئولون عن نجاحه.

2- تدريب كادر خاص للقيام بعمليات التنظيف والتطهير والتعقيم، وأن يكون من بين هذا الكادر من له دراية واسعة وكفائه عالية بتكنولوجيا هذه العمليات وخصوصاً عند استخدام تقنيات حديثة مثل تقنية التنظيف المركزي (التنظيف في المكان) **Cleaning in place (CIP)**.

<u>عمليات التنظيف في مصانع الأغذية والألبان:</u>

قبل أن نتطرق إلى عمليات التنظيف في مصانع ومعامل الأغذية والألبان، يجب أن نعلم بأنه ليس هناك من مواد التنظيف أو التطهير ما هو مناسب للعمل تحت جميع الظروف، ولأجل اختيار أفضل المنظفات والمطهرات يجب أن نأخذ بعين الاعتبار النقاط التالية:

1- نوع الأوساخ والبقايا المراد تنظيفها.

2- طبيعة ونوع أسطح الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات المراد تنظيفها، ويلاحظ في الوقت الحاضر بأن أجهزة ومعدات مصانع الأغذية والألبان الحديثة مصنعة من الفولاذ غير القابل للصدأ الذي يتصف بمقاومته العالية لكثر من العوامل التي قد تؤثر على بعض المواد الأُخرى ، كما أنه يتصف بسهولة تنظيفه وتطهيره والاحتفاظ به خاليا من الأحياء المجهرية.

3- طبيعة مواد التنظيف أو التطهير نفسها وقابليتها للتفاعل مع ما حولها، حيث تؤخذ هذه النقطة بعين الاعتبار وخصوصاً في حالة التنظيف اليدوي.

4- درجة عسرة الماء المستخدم في عمليات التنظيف، فالمركبات المعتمدة الاستعمال مع الماء اليسر لا تعمل بشكل جيد مع الماء العسر حيث تكون قابليتها للتنظيف محدودة.

5- أن تتصف هذه المواد بكون بقاياها أو رواسبها غير ضارة في حالة وصولها أو تلويثها للمنتجات.

وتستعمل في مصانع ومعامل الأغذية والألبان مواد منظفة ذات خواص معينة يؤدي استعمالها إلى إزالة بقايا المواد التي جرى تصنيعها من الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات المستعملة، وهذه المواد ليس بالضرورة أن تكون مُعَقِمة حيث أن غالبيتها تعجز عن قتل الأحياء المجهرية، لذا يجب إجراء التعقيم سواء بالبخار أو الماء الساخن أو باستعمال بعض المواد الكيميائية مثل الكلورين بعد إجراء عمليات التنظيف المناسبة.

ويجب أن تزال بقايا المواد من الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات قبل إجراء عمليات التنظيف والتعقيم لذلك فإن عملية التعقيم لا تكون ذات جدوى في حالة استعمالها فقط بدون اللجوء إلى عمليات التنظيف قبل إجرائها، فبقايا الحليب ومنتجات الألبان المصنعة تكون بيئة مناسبة لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية حتى بعد إجراء عملية التعقيم فيما لو لم يتم إزالتها من تلك الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات المستخدمة في عمليات الإنتاج والنقل والتداول.

إن طريقة التنظيف والمواد المستعملة تعتمد على نوعية المنتجات المصنعة وطبيعة المعاملات التي تجرى في المصانع أو معامل الإنتاج، إضافة إلى الفترة الزمنية التي تركت فيها تلك البقايا بدون إزالة وفيما إذا جفت على هذه الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات مما يؤدي إلى صعوبة عملية التنظيف.

وتتم عملية التنظيف المتبعة في تنظيف أجهزة ومعدات وأدوات مصانع ومعامل الأغذية والألبان وفق الأسس التالية:

1- الغسل بالماء الدافئ الذي يزيل اكبر كمية من المواد العالقة ويقوم بالإذابة الجزيئية للدهون، ويجب أن يتم هذا بعد الانتهاء من عمليات الإنتاج مباشرة.

2- استعمال المحاليل المنظفة الساخنة والتي تذيب ما يتبقى في عملية الغسيل الأولي.

3- غسل بقايا المحاليل المنظفة بالماء البارد النقي قبل عملية التعقيم.

<u>المواد المنظفة ومراحل عملية التنظيف فى مصانع الأغذية والألبان:</u>

هناك عدة مراحل تمر بها عملية التنظيف اعتمادا على أنواع المنظفات، فالمنظفات المستعملة في المصانع أو معامل الإنتاج التي تجري فيها عمليات تصنيع معقدة مثل مصانع أو معامل إنتاج الألبان أو الأغذية الجاهزة حيث يكون الدهن والبروتين جزءاً رئيسياً من الغذاء المصنع يوجب أن تكون للمنظفات القابلية على تحليل الدهون أو صوبنتها (بتحويل الدهون إلى صابون + جليسرول وتجري هذه العملية بصورة جزئية في التنظيف السريع، حيث أن الصابون المتكون يعمل على تقليل الشد السطحي وزيادة الترطيب مما يسهل عملية التحلل المائي والاستحلاب) وكذلك لها القدرة على إذابة البروتينات أو تحليلها، إضافة إلى قابلية هذه المنظفات علي الاستحلاب Emulsification الذي يتم بتجزئة الدهون إلى دقائق صغيرة محاطة بطبقة مدمصة Adsorbed layer من ايونات المادة المنظفة، ونظراً لتشابه هذه الشحنات الكهربائية على أسطح الدقائق الصغيرة فإنها تتنافر ويتعذر التصاقها ببعضها مما يسهل عملية التخلص منها، وكلما كان الاستحلاب شديداً أصبحت الدقائق الصغيرة أصغر حجما مما يزيد المساحة السطحية وبالتالي زيادة كفاءة التنظيف) إضافة إلى قدرة هذه المواد المنظفة على الترطيب Wetting Power وقابلية الغسل والشطف لهذه المنظفات(حيث أن ذلك يعتبر أهم ما يجب أن تتصف به المنظفات، حيث يجب أن تكون هذه المنظفات سهلة الغسل وان تزال من أسطح الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات التي قمنا بتنظيفها بهذه المنظفات بعملية الغسل، فترك جزء من هذه المواد بما فيه من بقايا المواد المذابة أو المستحلبة يعني تلويث المنتج الجديد، كما أن الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات عند جفافها يظهر عليها اللون الأبيض نتيجة بقايا المواد المنظفة)، إضافة إلى قابلية هذه المنظفات على العمل كمادة منظمة Buffering Capacity وأن يكون لها صفات تعقيمية جيدة. <u>ويمكن أن تقسم المنظفات إلى قسمين هما:</u>

1- <u>المنظفات القاعدية</u>: مثل الصودا الكاوية وهي برغم مزاياها تعتبر من أسوأ المواد المنظفة من ناحية صعوبة غسلها، لذا يكمن الاستعاضة عنها ببعض أملاحها والتي تكون أسهل غسلاً منها، والأملاح التالية مرتبة حسب سهولة غسلها: سيليكات الصوديوم > فوسفات الصوديوم الثلاثية > ميتا سيليكات الصوديوم > كربونات الصوديوم > فوسفات الصوديوم الثنائية > اورثو سيليكات الصوديوم > الصودا الكاوية

2- <u>المنظفات الحامضية</u>: مثل حامض النتريك والذي يستعمل في تنظيف البقايا المتحجرة في الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات، ولا يكون له تأثير ضار على الفولاذ غير القابل للصدأ، وهناك أحماض أُخرى مستعملة مثل الخليك والجلوكونيك والتارتاريك والستريك وغيرها، ويجب أن يتم استعمال هذه المنظفات الحامضية بعد إجراء عملية تنظيف جيدة وبعد أن تزال بقايا المواد من الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات ويفضل استعمالها بدرجة حرارة 70°م.

عمليات التعقيم والتطهير في مصانع الأغذية والألبان:

تتبع عملية غسيل الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات في مصانع ومعامل الأغذية والألبان معامل عمليات تعقيم أو تطهير وذلك باستعمال محاليل لها القدرة على القضاء على الأحياء المجهرية، أو باستخدام المعاملات الحرارية حيث يستعمل البخار وذلك لرفع درجة حرارة تلك الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات بواسطته إلى درجة الحرارة القاتلة للأحياء المجهرية، وقد يستعمل الماء المغلي في المعامل الصغيرة لهذا الغرض وذلك بغمر بعض الأدوات إلى أن ترتفع درجة حرارتها إلى 82°م لمدة 25 – 30 دقيقة أو درجة حرارة 90°م لمدة 15 دقيقة، أما الأوعية المكشوفة فيجب استعمال البخار لتعقيمها.

أولاً: استعمال المعاملات الحرارية في التعقيم Heat sterilization:

تعتبر مصادر الحرارة كالبخار أو الماء الساخن أو الهواء الساخن من الطرق المتوفرة والمستعملة في تعقيم أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان، وقد أُستعملت طويلاً قبل ظهور وتصنيع المواد الكيميائية المطهرة الصالحة للاستعمال. وفي الوقت الحاضر لا تصمم مصانع ومعامل الأغذية والألبان على استعمال الحرارة في عمليات التعقيم بالرغم من إمكان استعمالها لتعقيم بعض الأجزاء والأدوات مثل الأنابيب الخاصة لنقل الحليب من الخزانات إلى ماكينات التعبئة، وفي بعض الحالات التي لا تعطي المواد الكيميائية نتائج جيدة في عمليات التطهير تستعمل مصادر الحرارة المذكورة سابقاً للتطهير وخصوصاً في مزارع إنتاج الحليب أكثر من استعمالها في مصانع ومعامل تصنيع الحليب ومنتجات الألبان معامل حيث تستعمل الحرارة في تطهير بعض الأجهزة مثل خزانات تزويد الحليب والأنابيب وأجهزة التعبئة وأجهزة التجنيس في عمليات التصنيع والتعبئة المعقمة (Aseptic processing and packaging). وهناك طرق مختلفة تستعمل لتطهير أجهزة معامل الألبان بالحرارة وقد اقترحت لهذا الغرض الطرق التالية:

1- <u>خزائن البخار Steam cabinets</u>: وتستخدم بكثرة في المعامل الصغيرة، حيث يتم التعقيم بوضع جميع الأواني والأدوات المراد تعقيمها في خزانة البخار بحيث تكون في موضع مناسب حيث يتم فتح صمام التهوية لغرض طرد الهواء البارد وعند السماح للبخار في الدخول إلى الخزانة يصرف الماء المتكثف من فتحة خاصة في أسفل الخزانة، ثم يفتح صمام البخار للسماح للبخار بالدخول بسرعة بطيئة لإعطاء الضغط المناسب للمرجل البخاري، وبعد أن تتجمع كميات كافية من البخار، يستمر البخار بالدخول إلى الخزانة لفترة مناسبة حتى تزيد درجة الحرارة عن 94°م ولمدة لا تقل عن 5 دقائق، ثم تبرد جميع الأدوات داخل الخزانة، ويفضل تجفيف الأدوات بعد معاملتها بالبخار.

2- أنفاق أو خزائن الهواء الساخن Hot air tunnels or cabinets: وهي أيضاً تستخدم بكثرة في المعامل الصغيرة، ويفضل أن يكون حجم الخزانة أو النفق كبيراً لكي تستوعب أكبر القطع حجماً من تلك الأجهزة أو الأواني أو الأدوات المراد تعقيمها، كما يجب أن تكون مصنوعة من المعدن مع وجود فاصل هوائي بين الجدران الداخلية والخارجية بسمك بوصة واحدة، وتكون القاعدة الداخلية لهذا النفق أو الخزانة مغلقة للسماح بحركة الهواء، ويعمل الصمام الموجود في أعلى النفق كمسيطر على خروج الهواء البارد كما تزود بمروحة لغرض توزيع الحرارة داخل النفق وبصورة متجانسة، ويجب أن يكون النفق مزود بترمومتر لقياس درجة الحرارة يوضع في أبرد مكان فيه. وتوضع الصفائح والأوعية بصورة مقلوبة داخل الخزانة أو النفق وترتب بطريقة تسمح بحركة الهواء الحار. وتحتاج عملية تعقيم الأجهزة والأدوات لمدة تتراوح بين 20 - 30 دقيقة عند وصول درجة حرارة الخزانة 82°م على الأقل، أما تبريد الأدوات والأجهزة فيجب أن يتم داخل النفق أيضا.

3- خراطيم أو أنابيب البخار Steam hoses or jet: يمكن تعقيم الأجهزة أو الأواني أو الأدوات أو الصفائح أو المصافي باستعمال خراطيم أو أنابيب البخار، ويجب أن لا تقل فترة تعريض هذه الأدوات للبخار عن دقيقة واحدة.

تعقيم وتطهير الأجهزة المتصلة مع بعضها Sterilization of assembled equipment:

تعامل مجموعة الأنابيب المتصلة مع بعضها بصورة منفصلة عند استعمال البخار لغرض التطهير وذلك بوضع أنبوب البخار داخل فتحة الدخول مع المحافظة على انسياب البخار من فتحة الخروج لمدة 5 دقائق بعد وصول درجة حرارة الماء الخارج إلى 94°م. أما الأجهزة المراد معاملتها بالبخار مثل اجهز التعبئة فيجب أن تكون هذه الأجهزة مقفلة خلال عملية التطهير، كما يمكن تطهير الأجهزة المتصلة مع بعضها البعض بواسطة ضخ ماء حار خلالها من فتحة دخول الحليب بحيث لا تقل حرارة الماء الخارج من الجهاز عن 77°م لمدة لا تقل عن 5 دقائق.

ثانياً: التطهير الكيميائي Chemical sterilization:

هناك العديد من مواد التطهير الكيميائي التي تتأثر بكثير من العوامل منها درجة تركيز هذه المواد ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني pH ودرجة نظافة الأجهزة.....الخ. وتعتبر مركبات الكلورين من أكثر مواد التطهير الكيميائي المستعملة في مصانع ومعامل الأغذية والألبان، وإضافة إلى مركبات الكلورين هناك أيضاً مركبات اليود ومركبات الأمونيوم الرباعية والتي تستخدم جميعها في تطهير الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات الموجودة في تلك المصانع أو المعامل، وكذلك هناك المنظفات المطهرة التي تستخدم لغرض تنظيف وتطهير هذه الأجهزة والمعدات.

وتعتبر درجة الحرارة مهمة جدا لإظهار فعالية مواد التطهير الكيميائي، حيث يسبب انخفاضها بمقدار 10°م مضاعفة الوقت اللازم لمعاملة الجهاز بمحلول الكلورين مثلاً، كما أن الزيادة في التركيز يمكن أن تعوض عن انخفاض درجة الحرارة. إن معاملة الأجهزة الملوثة بشكل كبير بمواد التطهير الكيميائي مثل محلول الكلورين يسبب انخفاضاً في فعاليته نتيجة لارتباط الكلور مع الأوساخ، كما أن طريقة استخدام هذه المواد المطهرة مهم في تحديد درجة تركيز هذه المواد، فعلى سبيل المثال إن تركيز الكلور المستعمل بكثرة يتراوح ما بين 100 - 200 جزء بالمليون عندما يكون التطهير بطريقة التغطيس أو الغمر، أما إذا كان التطهير بطريقة الرذاذ فإن التركيز يجب أن يضاعف. ونظراً لما تسببه محاليل الكلور من تآكل للأسطح المصنوعة من الفولاذ غير القابل للصدأ لذا الضروري الحد من استعمال التراكيز العالية منه (بين 500 - 1000 جزء بالمليون)، كما يجب أن يكون الوقت اللازم لتدوير محلول الكلور لمدة 3 - 5 دقائق وبتراكيز مسموح باستعمالها وينصح مصنعي الأجهزة عادة أن لا تزيد درجة الحرارة عن 38°م، وأن تجري عملية التطهير قبل عملية التصنيع مباشرة ولا يمكن أن تعتبر جزءا من عملية التنظيف لمصانع ومعامل الأغذية والألبان، ويفضل هؤلاء المصنعون أن يتم خلال الـ 15 - 20 دقيقة التي تعقب عملية التطهير بالكلور شطف الأجهزة بالماء ثم يعاد تطهيرها قبل العملية التصنيعية.

إن معظم المواد الكيميائية القاتلة للبكتريا تكون من النوع السام، ولهذا فلا تستعمل عادة في الأغذية أو في إبادة البكتيريا الموجودة في العبوات الغذائية، كما يجب عدم استعمال أي مادة تسبب إعطاء روائح أو طعوم غير مقبولة للمنتج أو لها تأثير على سلامة المستهلكين صحيا، ويعتبر الكلور من المواد الفعالة في القضاء على الجراثيم تحت بعض الظروف ويستعمل في مصانع الأغذية والألبان للسيطرة على البكتيريا في أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان، حيث لا يعتبر الكلور ساما إذا ما أُستعمل بتراكيز واطئة. ويمكن استعمال محاليل الكلور الساخنة في تطهير أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان، ولقد تم تسخين محاليل الكلورين إلى درجات (27 و 49 و 60 و 71°م) ولفترات معينة ولغاية 2.5 ساعة وقد لوحظ أن هذه المحاليل قد حافظت على تراكيزها الأولية في جميع الحالات عند عدم وجود مواد عضوية ملوثة، إن تسخين محلول هايبوكلورايد الصوديوم (يحتوي على الكلور بتركيز مقداره 150 جزء بالمليون) إلى الغليان في إناء مفتوح ولمدة 30 دقيقة قد سبب انخفاض تركيز الكلور إلى 142 جزء بالمليون، ويبدو أن الفقدان في الكلور الموجود في المحاليل الساخنة لا يكون كبيراً جداً بحيث يوثر على فعالية في تطهير أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان، ومن المتوقع أن يكون الفقد في تركيز الكلورين أقل في الأجهزة المغلقة مثل جهاز البسترة السريعة، هذا ومن المفضل استعمال درجة حرارة 38°م مع تحديد الوقت اللازم لتعريض محلول الكلورين للأسطح المصنوعة من الفولاذ الغير قابل للصدأ.

المواد الكيميائية المطهرة المستخدمة في مصانع ومعامل الأغذية والألبان:

كما عرفنا أن مركبات الكلورين و مركبات اليود ومركبات الأمونيوم الرباعية تستخدم جميعها في تطهير الأجهزة والمعدات والآلات والأدوات الموجودة في مصانع ومعامل الأغذية والألبان، إضافةً إلى المنظفات المطهرة المزدوجة الاستخدام، وهذه المركبات ليست نوعاً واحداً وإنما تحتوي على أكثر من نوع وقد تختلف في فعاليتها أو حالتها الفيزيائية أو غير ذلك.

أولاً مركبات الكلورين: تصنف مستحضرات الكلورين المطهرة إلى ما يلي:

1- غاز الكلور الذي يباع بحالة مضغوطة في اسطوانات حديدية ويمكن أن يمزج هذا الغاز مع الماء ويستعمل كمحلول معقم، كما يمكن مزجه مع محلول هيدروكسيد الصوديوم لإنتاج هايبوكلوريد الصوديوم **Sodium hypochloride**.

2- هايبوكلوريد الكالسيوم **Calcium hypochloride** يعرف هذا المركب كمسحوق قاصر (مبيض) **Bleaching powder** وهو متوفر بنوعين من المستحضرات، يحتوي أحدهما على الكلورين بنسبة 32 % تقريباً، أما الآخر فيحتوي على الكلورين بنسبة 64 % ومن عيوب هايبوكلوريد الكالسيوم أنه لا يذوب جيداً في الماء حيث يكون الكلور محلول حامض يعرف بـ **Hypochlorus acid** وبعد ترسب الجير **Lime** يؤخذ المحلول الرائق الحامضي ويستعمل في عمليات التعقيم، وهذا المحلول يفقد فاعليته بسرعة. ولكن من أهم مميزات هايبوكلوريد الكالسيوم أنه يعتبر أكثر قلوية وبالتالي أقل تآكلاً وضرراً للمعادن.

3- هايبوكلوريد الصوديوم **Sodium hypochloride** وتكون معظم مستحضرات الكلورين السائلة المتوفرة في الأسواق لغرض التطهير هي من نوع هايبوكلوريد الصوديوم، وتختلف فعالية هذا النوع نبعاً للتركيز والثبات. وقد تم تحضير هايبوكلوريد الصوديوم على شكل مسحوق وذلك باتحاد الكلورين مع ماء التبلور لمادة فوسفات الصوديوم الثلاثية، وتقاس قابلية هذا المركب للتعقيم بكمية الكلور الجاهز وهي مقاربة بقوتها إلى مادة هايبوكلوريد الصوديوم السائلة.

4- مركبات الكلورين الأخرى، فهناك العديد من هذه المركبات مثل مركبات كلورامين تي **Chloramine T** وغيرها الكثير والكثير من مركبات الكلورين التي تستخدم لأغراض التطهير. كذلك هناك المنظفات الكلورية **Chlorinated detergents** المستخدمة لعمليات الغسيل لأجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان، وهذه المنظفات أدت إلى تحسين فعالية التنظيف خصوصاً على الجزء البروتيني للمادة الصلبة اللبنية المتواجدة على سطح الأجهزة، كما أن استعمال هذه المنظفات يقلل التصاق الماء بالأسطح إضافة إلى أنها تحد من التلوث البكتيري لماء الغسيل، وتزداد فعالية المنظفات الكلورية بزيادة قلوية المحاليل.

ثانياً مركبات اليود Iodine Compounds:

تستخدم مركبات اليود لأغراض التطهير لأجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان. ويمتاز اليود بقابليته على تطهير أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان وكذلك أجهزة وأواني مزارع إنتاج الحليب، واليود من المركبات الكيميائية الثنائية الهالوجين، وتكون مركبات اليود فعالة عدما يكون الأس الهيدروجيني pH أقل من 6.5 أما درجة الحرارة فيجب أن تكون ثابتة ويفضل أن تكون في حدود الأربعينات مئوية نظراً لقابلية اليود على التطاير في درجات الحرارة التي تزيد عن 60°م، وهنالك نوعان من مركبات اليود هما:

1- أيودوفور Iodophor: و هذا المركب لا يذوب بصورة جيدة في الماء، ويحب توفير مادة حاملة له لحفظ اليود إلى وقت تحضير محلول التطهير لإعطاء نتيجة تطهير جيدة. إن مركب الأيودوفور يتكون من معقد مؤلف من اليود مرتبط ارتباطاً ضعيفاً مع مواد ترطيب غير أيونية وعند إضافة الأيودوفور إلى الماء يتغير لون الماء إلى الأصفر نتيجة أن اليود قد بدأ بالتحرر ونحصل بذلك علي محلول التطهير، وتدل شدة اللون دلالة تقريبية على مقدار تركيز المحلول المطهر، وعد استخدامه كمادة مطهرة فغالباً ما يستعمل تركيز 12.5 جزء بالمليون، أما عند استعماله كمحلول منظف مطهر فيستعمل بتركيز قدره 25 جزء بالمليون.

2- كلورأمين- ت أيودايد البوتاسيوم Chloramine-T Potassium Iodide: وهو أحد مركبات اليود المستخدمة لأغراض التطهير في مصانع الأغذية والألبان، ويتكون من مركب كلورأمين- ت مع مركب أيودايد البوتاسيوم، وعند إضافة المركب إلى الماء يتحرر الكلور من مركب كلورأمين- ت ويقوم بأكسدة أيون اليود إلى يود حر حيث نحصل على المحلول المطهر.

ويمتاز الأيودوفور عن كلورأمين- ت أيودايد البوتاسيوم بكونه أكثر ثباتاً وأقل ضرراً وتآكلاً لأسطح الأجهزة كما يمتاز أيضاً بقلة تلوينه للأجهزة والأواني مقارنةً بالكلورأمين- ت أيودايد البوتاسيوم ويجب أن يراعى عدم ظهور طعم اليود في منتجات الألبان كما يجب السيطرة على تراكيز محاليل اليود المستعملة في عمليات التطهير وكذلك التأكد من شطف كافة الأجهزة والتخلص من مركبات اليود قبل البدء بعمليات التصنيع.

ثالثاً مركبات الأمونيوم الرباعية Quaternary Ammonium Compounds (QAC):

مركبات الأمونيوم الرباعية من المركبات الكيميائية المستخدمة منذ زمن طويل في تطهير عبوات وأواني الحليب وكذلك أجهزة تصنيع الحليب. ويمكن تحضير أنوع عديدة من مركبات الأمونيوم الرباعية اعتمادا على المجموعة التي تستعمل للإحلال محل ذرات الهيدروجين للأمونيا. غير أن استعمال هذه المادة في البداية كمادة مطهرة لم يكتب لها النجاح مما جعل بعض الجهات الصحية تمنع استعمالها، أما في الوقت الحاضر فقد تمكن العلماء من إنتاج أنوع عديدة من مركبات الأمونيوم الرباعية وقد أثبتت فعاليتها كمواد مطهرة جيدة. وتختلف فعالية هذه المركبات

في القضاء على الأحياء المجهرية حسب اختلاف المادة الداخلة في تكوينها وكذلك التركيب الكيميائي وتركيز المادة الفعالة ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني pH ومدة التعرض لمحاليل هذه المواد وكذلك وجود المواد المضادة في الماء بصورة طبيعية.

ومن مميزات مركبات الأمونيوم الرباعية أنها عديمة الرائحة وغير سامة ولا تسبب تآكل أسطح الأجهزة والمعدات كما أنه ليس لها تأثير ضار على الأيدي أو ضرع البقرة. تكون هذه المركبات فعالة في الماء الساخن ولكنها تتأثر قليلاً بتغير الأس الهيدروجيني pH مقارنة بالهايبوكلورايد أو مركبات اليود، كما أن وجود الصابون والفوسفوليبيدات والكالسيوم والمغنيسيوم يقلل من فعالية هذه المركبات. ويعود انتشار استعمال مركبات الأمونيوم الرباعية إلى مقدرتها على الترطيب وقابليتها للانتشار على الأسطح النظيفة وتكوينها طبقة مانعة لنمو البكتيريا. وبعد عملية تطهير الأجهزة باستخدام مركبات الأمونيوم الرباعية يجب شطف مواد التطهير تماماً من الأجهزة نظراً لأن بقايا هذه المحاليل تؤثر على الطعم إضافة إلى أن كميات قليلة منها بقدر 3 جزء بالمليون تسبب عرقلة نمو بكتريا البادئ.

التطهير الكيميائي للأجهزة المتصلة مع بعضها:

إن جميع المركبات الكيميائية المذكورة أعلاه (مركبات الكلورين ومركبات اليود ومركبات الأمونيوم الرباعية) تستعمل كمطهرات للأجهزة المتصلة مع بعضها ويجب أن يكون تركيز قوة المحلول في نهاية عملية التطهير وبعد خروجه من الجهاز أعلى من أوطئ تركيز تتم فيه عملية التطهير بنجاح. إن المحلول الكيميائي يجب أن يضخ في جميع أجزاء الجهاز المربوط ولمدة دقيقة واحدة على الأقل، كما يجب فك أماكن الارتباط والاتصال بين أجزاء الجهاز حتى يمكن معاملة الحلقات المطاطية الموجودة بين التوصيلات بالمحلول، إلا في الحالات التي يتم فيها تنظيف الأجهزة بتقنية التنظيف المركزي (CIP) فلا حاجة لمثل هذا الإجراء. أما الأسطح التي لا يصلها المحلول المطهر فيمكن تطهيرها باستعمال البخار أو بطريقة الرذاذ أو بأي أسلوب آخر مناسب لهذه الأسطح.

المنظفات المطهرة Detergent - Sterilizers:

لقد تم مزج بعض مواد التطهير ومواد التنظيف لإنتاج منتج يمكن له تنظيف وتطهير أجهزة ومعدات وأدوات مصانع الأغذية والألبان في عملية واحدة، مع العلم أن معاملة الأجهزة بعملية التنظيف ثم عملية التطهير وبصورة منفصلة يكون أكثر فعالية من اشتراكها بعملية واحدة، حيث أن وجود بقايا الحليب المتحجرة تسبب انخفاضا سريعا في فعالية المنظفات المطهرة مقارنة بالمعاملة التطهيرية المنفصلة بعد عملية التنظيف كمعاملة الغرض منها القضاء على الأحياء

المجهرية، وعلى العموم فهنالك العديد من هذه المركبات نجح استعمالها خصوصاً في مزارع إنتاج الحليب، هذا ويمكن الحصول على نتيجة جيدة في معاملة واحدة عند إتباع ما يلي:

1- يجب شطف الأجهزة جيدا قبل المعاملة بالمنظفات المطهرة مباشرة.

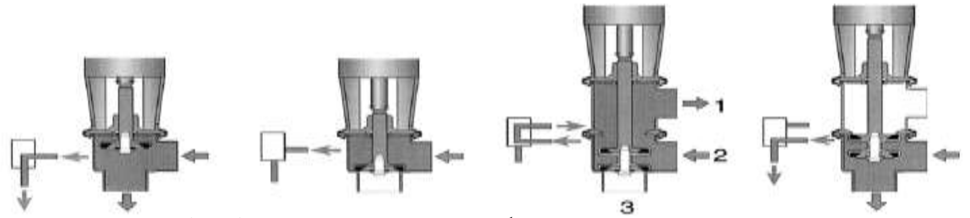
2- عند تحضير المحاليل يجب إتباع توصيات وتعليمات منتجي هذه المواد.

3- عند تعرض الأجهزة إلى أي نوع من أنوع التلوث الضار مثل ماء الشطف غير المعامل أو عند تداول أجزاء ماكينات الحليب أو تعرض الأسطح المعاملة إلى الهواء الملوث قبل الاستعمال يجب أن يعاد تطهيرها قبل استعمالها مرة أُخرى.

وتتكون معظم المنظفات المطهرة من مزيج من مركبات الأمونيوم الرباعية ومواد الترطيب غير الأيونية والمحورة باستعمال بعض القواعد أو الفوسفات.

التنظيف المركزي (التنظيف في المكان) Cleaning in place (CIP):

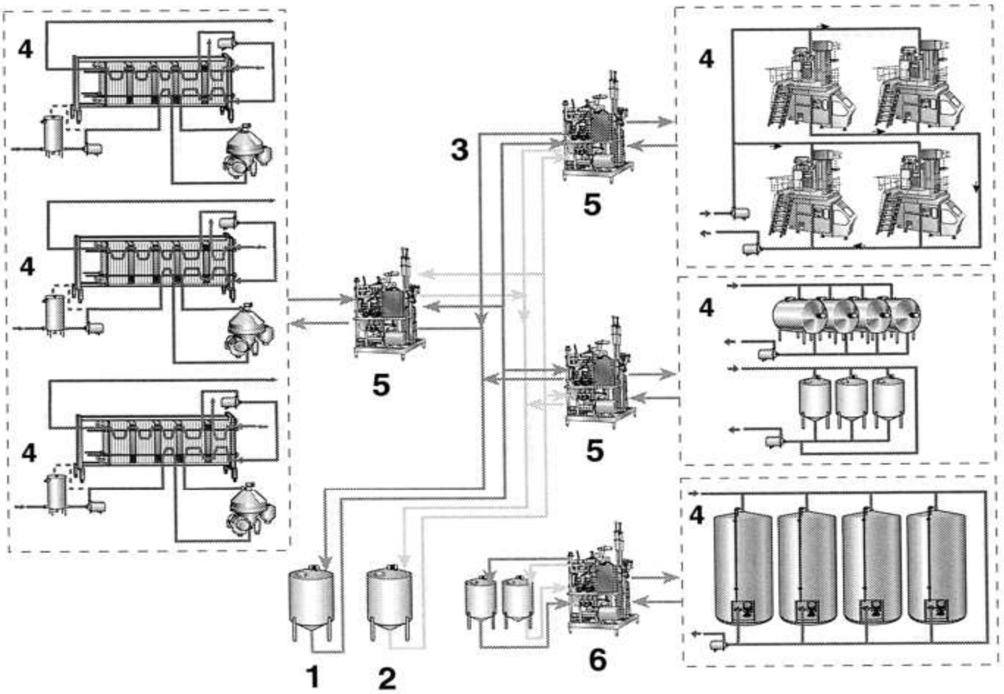
إن وجود نظام معين يسمح بإجراء عمليات التنظيف اللازمة دون إجراء فصل الأجزاء المختلفة للأجهزة والمعدات والأدوات المستخدمة في مصانع الأغذية والألبان شكل طفرة تكنولوجية مهمة في مجال صناعة الألبان. وقد كان لتطور أنظمة التنظيف المركزي تأثيراً كبيراً على العمليات التصنيعية لمصانع الأغذية والألبان. يتطلب الاستعمال الفعال لنظام التنظيف المركزي جريان مستمر للمحلول المنظف خلال الأنابيب التي لم يعُد من الضروري تفكيكها يوميا لغرض التنظيف، إضافةً إلى تلك الصمامات المطورة التي تدار هوائياً والأنابيب المتصلة مع بعضها البعض والتي لم يعُد هناك حاجة لتفكيكها وهذا يُعَد من عوامل نجاح نظام التنظيف المركزي، وقد أمكن من خلال استعمال برنامج منظم في عملية التنظيف باستخدام الحاسب القيام بعملية تنظيف الأجهزة بصورة أوتوماتيكية بشكل كامل. وعند استعمال نظام التنظيف المركزي لمصنع جديد أو عند تحوير نظام التنظيف باستعمال نظام التنظيف المركزي فإن أول الأمور التي يجب دراستها هي خط سير المنتج وكذلك ترتيب الأجهزة. ومن أهم العوامل الواجب مراعاتها وضع وترتيب الأجهزة بحيث يكون طول الأنابيب أقل ما يمكن وتكون لهذه الأنابيب الطاقة القصوى من حيث عمليتي التصنيع والتنظيف، كذلك من الضروري جدا تركيب أكبر عدد من الأنابيب بصورة دائمة، حيث إن تركيب واستعمال الأنابيب المتصلة بصورة دائمة وبدرجة انحدار مناسبة يعتبر من الأمور المهمة في نظام التنظيف المركزي، كذلك ينبغي عدم استعمال القطع الموصلة إلا عند الضرورة القصوى، ويجب أن تتم جميع عمليات التصنيع بصورة كاملة ودون الحاجة إلى تبديل أو تحوير الأنابيب.



الشكل رقم (250) يوضح الصمامات التي تدار هوائياً لتنظيم حركة مرور منتجات الألبان أو محاليل التنظيف في مصانع الأغذية والألبان الحديثة، عن (Bylund, 1995).

ويمكن أن يكون نظام التنظيف المركزي بسيطا أو معقداً حسب الغرض منه، حيث يمكن أن يكون بسيطا وذلك بوجود وحدة تدوير واحدة لجهاز البسترة السريعة مثلاً أو أي جزء من خط الإنتاج فقط، أو أن يكون نظاما أوتوماتيكياً كاملاً يتألف من العديد من وحدات التدوير ومزوداً بعدة مراكز للتنظيف المركزي. ويعتمد عدد وحدات التدوير على حجم المصنع وعلى نوع المنتج المصنع ومن المفضل أن يصمم الجهاز بحيث يمكن غسل وتنظيف جزء من الأجهزة فيما تبقى

الأجزاء الأخرى مستمرة في العملية الإنتاجية، من أجل تقليل الوقت الكلي اللازم للتنظيف، بحيث يمكن أن تشمل الدورة الأولى خط أنابيب الحليب الخام من قسم الاستلام إلى خزانات الحليب، بحيث يمكن القيام بتنظيف هذه الدورة وإتمامها قبل أن يكون جهاز البسترة السريع جاهزاً للمعاملة الحرارية، أما الدورة الثانية فيمكن أن تشمل خزانات الحليب والأنابيب المشتركة معها، أما الدورة الثالثة فيمكن أن تشمل جهاز البسترة السريعة والأنابيب الموصلة معها، في حين يمكن أن تتضمن الدورة النهائية أنابيب وخزانات التزويد ومن هذه الخزانات إلى أجهزة التعبئة، كما هو موضح في الشكل التالي، فعند توفر مثل هذه الدورات يمكن لعمليات التصنيع والتنظيف أن تحرى سوية دون إضاعة الوقت.



1- خزان المنظفات القاعدية (القلوية)، 2- خزان المنظفات الحامضية، 3- خطوط أنابيب المنظفات، 4- الأجهزة والمعدات التي ستتم لها عملية التنظيف بشكل دورات مستقلة لكلٍ منها، 5- وحدات التدوير لنظام CIP تابعة للنظام المركزي الكامل، 6- وحدة تدوير نظام CIP مستقلة (لامركزية) خاصة بجزء من خط الإنتاج، مع خزانات المنظفات التابعة لها.

الشكل رقم (251) يوضح نظام التنظيف المركزي **Cleaning in place (CIP)** ، عن **(Bylund, 1995)**.

<u>خطوات نظام التنظيف المركزي</u>: وتعتمد على تصميم النظام وبصورة عامة تتضمن ما يلي:

1- شطف Rinse الأجهزة والمعدات في بداية العملية لإزالة المواد العالقة ويتم ذلك بالماء البارد.

2- تمرير محاليل التنظيف الساخنة.

3- شطف الأجهزة والمعدات لإزالة البقايا العالقة من مواد التنظيف.

ولنجاح هذه العملية يجب مراعاة ما يلي:

1- شطف الأنابيب جيداً وبأسرع وقت ممكن بعد انتهاء عملية التصنيع.

2- غسل نهايات زوايا الأنابيب المرتبطة وكذلك الحلقات المطاطية بصورة جيدة قبل وضعها في أماكنها في نظام التنظيف المركزي.

3- تركيب مضخات وأنابيب التوصيل ومضخات الرجوع ومفاصل دورة نظام التنظيف المركزي.

4- إجراء عملية التنظيف والتطهير لكل دورة من نظام التنظيف المركزي حسب توصيات منتجي الأجهزة ومواد التنظيف.

ويمكن تلخيص الخطوات المختلفة التي تجرى في أنظمة التنظيف المركزي بالخطوات التالية:

1- شطف الأجهزة والمعدات باستخدام الماء.

2- إزالة ماء الشطف.

3- سحب الماء من حوض مادة التنظيف، وإضافة المقدار المقرر من مادة التنظيف ثم تسخين الخليط.

4- تدوير محلول التنظيف خلال النظام ثم إلى حوض مادة التنظيف.

5- بعد التدوير، يجمع محلول التنظيف ويتم إعادته إلى حوض مادة التنظيف، وإذا أصبح محلول التنظيف ملوثاً يتم تحويله إلى المجاري للتخلص منه.

6- يدور ماء الشطف وفي البداية يتم تحويله إلى حوض مادة التنظيف لنقل ما تبقى من محلول التنظيف.

7- يزال ماء الشطف من الأنابيب الرئيسة، ويتم تدويرها وتوجه إما إلى خزان الاسترداد أو إلى المجاري.

تتضمن عملية التنظيف معاملة جميع الأسطح التي تكون في تماس مع المنتج بعد انتهاء عملية التصنيع وإزالة جميع المواد الصلبة المرئية وكذلك معاملة هذه الأسطح بمواد قاتلة للأحياء المجهرية وذلك لتطهير جميع الأسطح، أما الأسطح التي لا تكون في تماس مع المنتج فيشملها التنظيف أيضا. إن فترة تشغيل الأجهزة خلال العملية الإنتاجية اليومية هي أقل من يوم وبهذا فان كلا من الخزانات والأحواض والأنابيب والمضخات والصمامات وجهاز البسترة السريعة وأجهزة التعبئة يجب أن تنظف مرة واحدة على الأقل كل 24 ساعة، وقد تستعمل بعض الأجزاء لمدة طويلة مثل الأنابيب أو بعض الخزانات، فيكون تنظيفها بعد الفراغ منها.

<u>**ومن البرامج النموذجية المتبعة في نظام التنظيف المركزي ما يلي:**</u>

1- يمكن تنظيف الأجهزة المستعملة في تصنيع الحليب و حليب الفرز والمنتجات المنخفضة الدهن بصورة كفؤه عند تدوير محلول التنظيف الحامضي لمدة 20 - 30 دقيقة ومن ثم يدور محلول التنظيف القلوي المركز لمدة 45 - 60 دقيقة، ويمكن أن يشطف الجهاز بالماء البارد بين المعاملة بالحامض والقاعدة.

2- يمكن تنظيف الأجهزة المستعملة في تصنيع القشدة والمثلجات اللبنية بكفاءة أكبر إذا تم تدوير المحلول القلوي أولاً ولمدة 30 - 45 دقيقة ثم يتبع ذلك الشطف بالماء ثم يدور محلول التنظيف الحامضي لمدة 25 - 30 دقيقة، ويفضل أن يكون تركيز المحلول القلوي المستعمل في البرامج المذكورة أعلاه بمدى قدره 0.5 – 1.5 % قلوية، ويكون محلول التنظيف الحامض ذو أس هيدروجيني pH يتراوح بين (2 – 2.5).

إن درجة حرارة محاليل التنظيف خلال فترة تداورها يجب أن تزيد بحوالي 6°م عن درجة الحرارة المستعملة للتصنيع خلال العملية الإنتاجية اليومية. ويعتمد نجاح عملية التنظيف المركزية لأجهزة التبادل الحراري جزئياً على كيفية تشغيل هذه الأجهزة خلال عملية تصنيع المنتجات. فمثلا يؤدي استعمال البخار بضغط عالي وسرعة تسخين كبيرة مع عدم التحريك بصورة جيدة أو فتح البخار قبل أن تغطي جميع الأسطح بالمنتج إلى حرق المواد على السطح مما يؤدي إلى صعوبة إزالتها عند استخدام برامج التنظيف الاعتيادية. ونتيجة لذلك يجب أن تنظم كل من الحرارة والوقت وتركيز محاليل التنظيف لتجنب هذه المشكلة.

برنامج مراقبة الشئون الصحية لمصانع ومعامل الأغذية والألبان

يتضمن برنامج مراقبة الجودة اختبار الشؤون الصحية (Hygiene) لمصانع ومعامل منتجات الألبان ومدى نقاوة الهواء في صالات التصنيع وصالات التعبئة تحت الظروف شبه المعقمة ومراقبة الحالة الميكروبيولوجية للمعدات (اختبارات النظافة Sanitation test).

السيطرة على الأحياء المجهرية في هواء صالات التصنيع:

لأجل الحصول منتجات ذات جودة عالية ولمنع الأحياء المجهرية المسببة للأمراض أو المنتجة للسموم أو تلك المسببة لفساد وتلف منتجات الألبان من الوصول إلى تلك المنتجات، يجب أن توفر عناية خاصة لمنع التلوث بواسطة الأحياء المجهرية الموجودة في الهواء أثناء التصنيع وبعده. يعتبر العمال هم المصدر الرئيس لتلوث الهواء بالأحياء المجهرية، إضافةً إلى مواد التعبئة والتغليف. والتهوية الجيدة تزيل الرطوبة التي تنتج أثناء التصنيع ، وبذلك تؤدي إلى حماية المبنى والأجهزة وتمنع تكثف الرطوبة وبالتالي تمنع نمو الفطريات على الأسطح. وقد لوحظ أن التهوية بدون مرشحات تزيد من احتمال التلوث عن طريق الهواء بدرجة كبيرة، لذلك يجب توفير أجهزة تنقية ميكانيكية للهواء (باستخدام المرشحات) في مصانع ومعامل منتجات الألبان.

وتتكون ميكروبات الهواء أساسا من الخمائر والأعفان وأنواع متعددة من البكتيريا مثل جنس *Bacillus* والبكتيريا الكروية *Micrococci* كما يمكن آن يحتوي الهواء أيضا على المكورات العنقودية *Staphylococcus* وجنس *Croynebacterium* وقد يتلوث الهواء ببكتيريا السالمونيلا Salmonella، وقد يكون السيناريو الأسوأ تلوث صالات إنتاج الجبن والألبان المتخمرة بالبكتيريوفاج Bacteriophages. ويتمثل المصدر الرئيس لتلوث الهواء في وجود عيوب في نظام التهوية ودخول الهواء ونظام الصرف الصحي والعمال. ولخفض المحتوى الميكروبي يجب تنقية الهواء بواسطة مرشحات ذات كفاءة عالية والتي تزيل 90 - 99 % من الجزيئات ذات حجم واحد ميكرون أو أكبر والمرشحات ذات الكفاءة الفائقة تزيل على الأقل 99.9 % من جميع الجزيئات ذات الحجم بين 0.1 إلى 2 ميكرون أو أكبر.

اختبارات عد الأحياء المجهرية في الهواء:

من الممكن أن تُجرى اختبارات عد الأحياء المجهرية في الهواء باستخدام العد بأطباق بتري بعد فتحها وتعريضها للهواء لفترة زمنية محددة، وقد أُستخدمت هذه الطريقة ولسنوات عديدة، ولكن معدل ترسيب الميكروبات واعتماد النتائج على حركة الهواء أدى إلى التفكير في إيجاد طرق أخرى. وتوجد حاليا طرق عديدة لسحب عينات من الهواء وزرعها على أسطح بيئات عامة أو اختيارية في أشرطة خاصة أو حتى في الأطباق أو على مرشحات غشائية. وأبسط هذه الطرق تتمثل في سحب كمية من الهواء وضخه في ماء معقم، ومن ثم إيجاد العد البكتيري فيه.

السيطرة على الأحياء المجهرية في خطوط التعبئة تحت الظروف المعقمة:

تنطبق الاحتياطات الميكروبيولوجية الخاصة بصالات الإنتاج أيضا على الصالات التي تحتوي على خطوط التعبئة تحت الظروف المعقمة، كما أن هناك احتياطات إضافية يجب آن تتخذ للحد من التلوث الميكروبي في هذه الصالات، إذ يجب أن يكون ضغط الهواء داخلها أعلى من ضغطه في الخارج. ويجب أن تكون هذه الصالات مفصولة بجدار زجاجي يسمح للمختصين والزوار بمتابعة عمل الأجهزة دون الدخول إلى داخل هذه الصالات. كما يجب أن تغطي الجدران بمواد سهلة التنظيف والتطهير وتكون الأبواب ذاتية الغلق كما يجب أن تكون النوافذ يجب أن تكون مغلقة أثناء الإنتاج، ولكن يمكن فتحها عندما تكون ألآت التعبئة متوقفة عن العمل للسماح للتهوية الجيدة. أما الفتحات خلال الجدران كالتي للسيور المتحركة وغيرها فيجب أن تكون أصغر ما يمكن للتقليل من التلوث بميكروبات الهواء، ويجب تجنب تداول الأدوات ومواد التعبئة داخل صالات التعبئة. كما يجب أن تزود بمصارف كافية سهلة التنظيف وميلان في الأرضية يسهل تصريف المياه، حيث إن المياه المتجمعة تسبب تلوث الهواء داخل هذه الصالات، ويلزم إضافة مادة تطهير للمياه المتجمعة في فتحات الصرف بكمية كافية للقضاء على الأحياء المجهرية. وتتم هذه العملية في الصباح قبل بدء عمليات التشغيل بخمس دقائق. وتوجد عدة طرق للحد من التلوث الميكروبي عن طريق الأحذية في غرف التعبئة شبه المعقمة، فمثلاً يجب وضع قطع من الاسفنج مبللة بمادة مطهرة مثل هايبوكلوريد الصوديوم لمسح الأحذية وتطهيرها قبل الدخول للغرف، وهذه القطع يجب أن تنظف مرتين كل أسبوع على الأقل. كما يجب توفير أماكن للغسيل مزودة بماء ساخن وبارد وصابون ومادة مطهرة ومناشف تستخدم لمرة واحدة، وكقاعدة عامة يجب غسل اليدين بالصابون المطهر قبل البدء في كل عملية إنتاج، وعند الدخول في كل مرة. كما يجب أن تحتوي الغرفة على حوض غسيل مزود بتوصيلات ماء حار وبارد، وتوصيلات المواد للتطهير وتنظيف أنابيب التعبئة والصمامات وغيرها، ولضمان عدم حدوث مشكلات في خطوط التعبئة تحت الظروف المعقمة يلزم توفير نظام تهوية جيد، يتضمن فتحات لإدخال الهواء المرشح وإخراجه، وهذه الفتحات يجب أن تركب على بعد 2- 3 متر من أجهزة التعبئة.

السيطرة على الأحياء المجهرية في غرف إنضاج الجبن وتخزينه:

تعتبر الأعفان من أهم الملوثات غرف إنضاج الجبن وتخزينه، ويمكن أن يتلوث الجبن المنتج بهذه الأحياء من الهواء والجدران والأسطح الأخرى مما يشكل مشكلة كبيرة لأنها يمكن أن تسبب عيوب في قوام الجبن وتغير طعمه وتجعل مظهره غير مرغوب. كما أن بعض الأعفان يمكن أن تنتج السموم الفطرية ولذلك فإن نمو الأعفان على الجبن لا يعتبر مشكلة اقتصادية فحسب، ولكن يمكن أن يشكل خطرا على صحة المستهلكين.

وللتغلب على وجود الأعفان في غرف إنضاج الجبن وتخزينه، يجب أن تعطي أهمية قصوى لنقاوة الهواء داخلها وتوجد الأعفان على الأسطح مثل الرفوف والجدران وغيرها، ويجب استعمال هواء نقي تحت ضغط موجب بالإضافة إلى الاهتمام بتدابير النظافة والتطهير من أجل الحد من نمو الأعفان. ويعد التبخير بالفورمالين بعد تفريغ الغرف من الجبن المنتج طريقة فعالة للقضاء على جميع الأحياء المجهرية، حيث يحضر محلول مائي من الفورمالين (38 % فورمالديهايد)، ويخفف بماء بنسبة 1:1، ويضاف إلى المحلول برمنجنات البوتاسيوم أيضا بنسبة 1:1، ويضاف المحلول النهائي بنسبة 6 – 10 جرام منه لكل متر مكعب من الحيز المراد تطهيره. كما أن التبخير باستخدام ببروميد الميثيل الذي يقتل سوسة الجبن التي لا يقتلها بخار الفورمالين.

وللحد من الأعفان الموجودة في الهواء يجب إتباع الاحتياطات الفعالة التالية:

1- التحكم الدقيق في درجات الحرارة والرطوبة النسبية، حيث أن درجات الحرارة المنخفضة يمكن أن تؤدي إلى ارتفاع الرطوبة النسبية التي تسمح بنمو الأعفان. ويجب تقليل الرطوبة النسبية إلى أقل من 80% حيث أن ذلك يساعد على الحد من نمو الأعفان، ولا ينطبق ذلك على غرف الإنضاج بالنسبة للأنواع المنضجة بالأعفان والتي يفضل أن تكون رطوبتها النسبية 95%.

2- يجب تغطية الجبن بغلاف شمعي أو مستحلب بلاستيكي لتجنب التلوث بالأعفان أو جراثيمها في غرف الإنضاج، أن تغليف الجبن بالمستحلب البلاستيكي المحتوي على المثبطات الفطرية مثل حض السوربيك أو سوربات البوتاسيوم أو غيرها من المثبطات الفطرية يحد من نمو الأعفان بدرجة كبيرة، ولكنه لا يوقفها تماماً.

3- يجب نقل الرفوف المستخدمة في غرف إنضاج الجبن وتخزينه إلى غرفة أُخرى لتنظيفها وتطهيرها، فالأرفف الخشبية المشبعة بالشرش تكون وسطا جيدا لنمو الأعفان، وبالتالي يمكن أن تكون مصدرا لتلوث الهواء. ولمقاومة نمو الأعفان غير المرغوبة يجب معاملة الأرفف من وقت لآخر باستخدام أحد المركبات المطهرة المذكورة سابقاً أو مزيج منها، وهناك طرق الأخرى للحد من الأعفان مثل استخدام الأشعة فوق البنفسجية أو المعالجة بالأوزون لكنها تعتبر طرقا فعالة.

لتقدير أعداد الأعفان بالطريقة الروتينية يمكن استخدام طريقة العد الكلي القياسي بطريقة الأطباق باستخدام أحد البيئات المناسبة وذلك بتعريض الأطباق وهي مكشوفة للهواء لمدة 15 دقيقة، ومن ثم تحضين الأطباق عند درجة حرارة 20 - 25°م لمدة 5 أيام على الرغم من أن هذه الطريقة ليست دقيقة جدا كما أسلفت سابقاً، كما يمكن استخدام إحدى الطرق الحديثة التي يعتمد فيها على تجميع الهواء بواسطة أجهزة معينة ثم إضافته وزرعه على أسطح بيئات عامة أو اختيارية في أشرطة خاصة أو حتى في الأطباق أو على مرشحات غشائية. وتعتبر الظروف مثالية داخل غرف الإنضاج عندما لا يظهر أي نمو للأعفان عند تقديره بتلك الطرق.

المـــــــــراجع

المراجع العربية:

١- **إسماعيل، أمين؛ أبو دنيا، سمير؛ وهبة، عبدالمنعم؛ يوسف، أحمد و سلامة، فاطمة (غير محدد):** الألبان. دار المطبوعات الجديدة، الاسكندرية، جمهورية مصر العربية.

٢- **إسماعيل، مجدى محمد؛ و سلامة، محمود (2005):** إنتاج وتصنيع الألبان في الوطن العربي. مكتبة الدار العلمية، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

٣- **الإتحاد العربي للصناعات الغذائية والمنظمة العربية للتنمية الصناعية (1982):** واقع وأفاق صناعة الألبان في الوطن العربي. دراسة معدة كورقة عمل مقدمة إلى المؤتمر العربي الأول للألبان المنعقد في دمشق بالجمهورية العربية السورية للفترة من 26 – 30 ابريل 1982م.

٤- **التومي، عبدالرزاق سليمان؛ و سعد، محمد الطاهر علي (2008):** بكتيريولوجيا مياه الشُرب. مركز بحوث التقنيات الحيوية. طرابلس، ليبيا.

٥- **الجليلي، زهير فخري؛ سعيد، عطا الله؛ و عزيز، سلوى ليلو (1985):** إنتاج وحفظ اللحوم. وزارة التعليم والبحث العلمي، مؤسسة المعاهد الفنية، بغداد، الجمهورية العراقية.

٦- **الحكيم، صادق حسن؛ و مهدي، عبد علي (1985):** تصنيع الأغذية (الجزء الأول). وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة بغداد، بغداد، الجمهورية العراقية.

٧- **الخفاجي، زهرة ناصر (2010):** أحياء الأغذية المجهرية. جزء مقتطع من الموسوعة الزراعية العربية/ مدخل علوم الأغذية/ منظمة الثقافة والتربية والعلوم/ جامعة الدول العربية).

٨- **الرجب، وفاء جاسم؛ و القزاز، حسن محمد علي (1982):** اساسيات علم الأحياء المجهرية الغذائي. وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة الموصل، الموصل، الجمهورية العراقية.

٩- **السفر، ثابت عبدالرحمن؛ عيد العمر، محمود؛ و الحمداني، رعد صالح (1982):** الحليب السائل. وزارة التعليم والبحث العلمي، بغداد، الجمهورية العراقية.

١٠- **الشبيبي، محسن محمد علي؛ طعمه، صادق جواد؛ شكري، نزار أحمد؛ و التكريتي، هيلان حمادي (1980):** مبادئ علم الألبان. وزارة التعليم والبحث العلمي، بغداد، الجمهورية العراقية.

١١- **الشرجبي، فهد عبدالحميد (2011):** أسس ميكروبيولوجيا الألبان. دار جامعة تعز للنشر والتوزيع، جامعة تعز، تعز، الجمهورية اليمنية.

١٢- **المواصفة القياسية اليمنية رقم (2002/384):** الحدود الميكروبيولوجية للسلع والمواد الغذائية – الجزء الأول (م. ق. ي 2002/384)، الهيئة اليمنية للمواصفات والمقاييس وضبط الجودة، الجمهورية اليمنية.

١٣- **جاسم، حامد عبدالله (1987):** تأثير التصنيع في الحليب. وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة بغداد، بغداد، الجمهورية العراقية.

١٤-**حسين، ماهر البسيوني (2001):** علم الفيروسات. النشر العلمي والمطابع، جامعة الملك سعود، الرياض، المملكة العربية السعودية.

١٥-**حيدر، عبدالرحمن (2005):** الأثر البيئي لاستخدام مياه الصرف الصحي في الري الزراعي (إب، صنعاء، ذمار)، الوحدة الرئيسية لمراقبة الفقر، وزارة التخطيط والتعاون الدولي، الجمهورية اليمنية.

١٦-**صالح، عبدالوهاب مهدي؛ و عيد العمر، محمود (1984):** صحة الألبان. وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة بغداد، بغداد،الجمهورية العراقية.

١٧-**عبدالمطلب، لطفي؛ وسليم، رياض محمد (1983):** صناعة الجبن والألبان المتخمرة. وزارة التعليم والبحث العلمي، بغداد، الجمهورية العراقية.

١٨-**عبود، أكرم ريشان؛ الصواف، سناء داود؛ و حمد، ضاري عليوي (1991):** صحة الغذاء. وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة الموصل، الجمهورية العراقية.

١٩-**سليم، رياض محمد (1986):** المثلجات اللبنية. وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة الموصل، الجمهورية العراقية.

٢٠-**شحاتة، عبده السيد؛ و المجدوب، محمد نبيل (2005):** ميكروبيولوجيا الجبن والألبان المتخمرة. المكتبة الأكاديمية، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

٢١-**محيو، عادل؛ كياي، علي زياد؛ و الميدع، الياس (1986):** علم الألبان. منشورات جامعة حلب، الجمهورية السورية.

٢٢-**نوفل، محمد عبدالرزاق (1989):** الطريق إلى الغذاء الصحي- أسس صحية علمية تطبيقية. (الطبعة الأولى)، الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، جمهورية مصر العربية.

المراجع الأجنبية:

1- **Andrews, W (1992):** Manual of food quality control, 4.Rev.1. microbiological analysis. Food and Nutrition Paper (14/4 Rev.1), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

2- **AOAC International (2000):** Official Methods Of Analysis of AOAC International, (17th Ed), AOAC International, Suite 500, 481 North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland, USA

3- **Bacteriological Analytical Manual Online (Online access):** Bacteriological Analytical Manual, Center for Food Safety & Applied Nutrition, U.S. Food & Drug Administration. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/Bacteri-ologicalAnalyticalManualBAM/default.htm

4- **Bamforth, C. W. (2005):** Food Fermentation and Microorganisms. Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company, Oxford, UK.

5- **Benson, A. E. (2001):** Microbiological Applications Lab Manual 8th Edition. The McGraw–Hill Companies, New York, USA.

6- **Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; and Staley, James T. (Editors), Garrity, George M (Editor-in-Chief) (2005):** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (2nd Ed), (Vol. 2) The *Proteobacteria*, (Part A Introductory Essays, Part B The *Gammaproteobacteria* and Part C The *Alpha-*, *Beta-*, *Delta-*, and *Epsilonproteobacteria*), Springer, New York, USA.

7- **Brown, Martyn and Stringer, Mike (Editors) (2002):** Microbiological risk assessment in food processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

8- **Bylund, G. (1995): In** Dairy Processing Handbook, Tetra Pak (Processing System Division) A/B, Lund, Sweden.

9- **Campbell-Platt, Geoffrey (2009):** Food Science and Technology. Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company, Oxford, UK.

10- **Carter, John B. and Saunders, Venetia A. (2007):** Virology, Principles and Applications. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.

11- **Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. and Eaton, A.D. (1999):** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition. American Public Health Association, Washington, USA.

12- **CSIRO (2010):** Make it safe: a guide to food safety. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

13- **De Vos, Paul; Garrity, G.M.; Jones, D.; Krieg, Noel R.; Ludwig, W.; Rainey, F.A. Schleifer, Karl-Heinz; and Whitman, William B. (Editors), Parte, Aidan C. (Managing Editor) (2009):** Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology, (2nd Ed), (Vol. 3) The *Firmicutes*, Springer, New York, USA.

14- **Diliello, L.R. (1986):** Methods in Food and Dairy Microbiology. AVI Publishing Company, Westport, Conn. USA.

15- **Downes, F.P. and Ito, K. (2001):** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (4th Edition), American public Health Association, Washington, USA.

16- **FAO (1998)**: Manuals of food quality control, 17. Unacceptable visible can defects - a pictorial manual. Food and Nutrition Paper (14/17), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

17- **Fox, P.F.; and McSweeney, P.L. (1998):** Dairy Chemistry and Biochemistry. Blackie Academic & Professional, Boundary Row, London, UK.

18- **Fox, P.F.; Guinee, T.P.; Cogan, T.M.; and McSweeney, P.L. (Editors) (2000):** Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.

19- **Fox, P.F; McSweeney, P.L.; Cogon, T.M.; and Guinee, T.P. (Editors) (2004):** Cheese: Chemistry, physics and Microbiology (3^{ed} Ed), Volume 1 General Aspects. Elsevier Academic Press. London, UK.

20- **Fox, P.F; McSweeney, P.L.; Cogon, T.M.; and Guinee, T.P. (Editors) (2004):** Cheese: Chemistry, physics and Microbiology (3^{ed} Ed), Volume 2 Major cheese Groups. Elsevier Academic Press. London, UK.

21- **Frazier, W.C (1967):** Food Microbiology (2^{ed} Ed), McGraw-Hill, Inc., New York, USA.

22- **Frazier, W.C and Westhoff, D.C. (1997):** Food Microbiology (4^{th} Ed), Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited. New Delhi, India.

23- **Garrity, George M.; Bell, Julia.; and Lilburn, Timothy G. (2003):** Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (2^{nd} Ed) Release 4.0 October 2003. Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_4_2003.pdf

24- **Garrity, George M.; Bell, Julia.; and Lilburn, Timothy G. (2004):** Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (2^{nd} Ed) Release 5.0 May 2004. Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf

25- **Garrity, George M.; Johnson, Kristin L.; Bell, Julia.; and Searles, Denise B. (2002):** Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (2^{nd} Ed) Release 3.0 July

2002. Bergey’s Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_3_2002.pdf

26- **Garrity, George M.; Winters, Matthew.; and Searles, Denise B. (2001):** Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology, (2nd Ed) Release 1.0, April 2001. Bergey’s Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_1_2001.pdf

27- **Garrity, George M.; Winters, Matthew.; Kuo, Austin W.; and Searles, Denise B. (2002):** Taxonomic Outline of the Procaryotic Genera Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology, (2nd Ed) Release 2.0, January 2002. Bergey’s Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_2_2002.pdf

28- **Goff, Douglas (Accessed, August 2008):** Dairy Science and Technology (an educational website) University of Guelph, Canada. www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html.

29- **Health Protection Branch (1981):** Examination of Canned Tomatoes, Tomato Juice and Vegetable Juice, Tomato Puree, Tomato Paste, Tomato Pulp and Tomato Catsup for Mould Filaments. The Compendium of Analytical Methods Volume 1: Official Methods for the Microbiological Analysis of Foods Official Method MFO-5, Government of Canada, Ottawa, Canada.

30- **Hogg, Stuart (2005):** Essential Microbiology. John Wiley & Sons Ltd,. West Sussex, England.

31- **Holt, John G. (Editor-in-Chief) (1984):** Bergey’s Manual® of Systematic Bacteriology, (1st Ed), (Vol. 1) Gram-negative *Bacteria* of general, medical, or industrial importance, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.

32- **Holt, John G. (Editor-in-Chief) (1986):** Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology, (1st Ed), (Vol. 2) Gram-positive *Bacteria* other than *Actinomycetes,* Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.

33- **Hui, Y. H.; Pierson, M. D.; and Gorham, J. R. (Editor) (2001):** Foodborne Disease Handbook, Volume 1: Bacterial Pathogens. (2nd Ed) Marcel Dekker Inc. New York Basel, USA.

34- **Jay, J.M.; Loessner, M. J. and Golden, D.A. (2005):** Modern Food Microbiology, 7th Edition (Food Science Texts Series) Springer, New York, USA.

35- **Jay, James M. (2000):** Modern Food Microbiology (6th Edition). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.

36- **Koepke, R.; Sobel, J.; and Stephen, S.A. (2007):** Global Occurrence of Infant Botulism, 1976-2006. Pediatrics 122 (1): e73 – e82.

37- **Kutz, M. (2007):** Handbook of Farm, Dairy, and Food Machinery. Co-published by: Springer B. V. and William Andrew Publishing, Norwich, New York, USA.

38- **Lambert, J.C. (1988):** Village milk processing. FAO Animal Production and Health Paper 69. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

39- **Law, B.A. (1997):** Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Blackie Academic & Professional, Boundary Row, London, UK.

40- **Leboffe, Michael J. and Pierce, Burton E. (2011):** A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory (4th Edition). Morton Publishing Company. Colorado, USA.

41- **Liu, Dongyou (2008):** Handbook of Listeria monocytogenes. CRC Press, Taylor & Francis Group, New York, USA.

42- **Ludwig, W.; Jean, E.; and Whitman, W.B. (2008):** Draft Taxonomic Outline of the *Bacteroidetes, Planctomycetes, Chlamydiae, Spirochaetes, Fibrobacteres, Fusobacteria, Acidobacteria, Verrucomicrobia, Dictyoglomi,* and *Gemmatimonadetes*. Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_4_Outline.pdf

43- **Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; and Whitman, W.B. (Accessed, October 2008):** Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. Bergey's Manual Trust, Bergey's Taxonomic Outlines. http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.pdf

44- **Lund, Barbara M.; Baird-Parker, T.C.; and Gould, G.W. (Editors) (2000):** The Microbiological Safety and Quality of Food (Volume 1& 2). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.

45- **Lund, Terje; De Buyser, Marie-Laure; and Granum, Per Einar (2000):** A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis, Molecular Microbiology, Volume 38, Issue 2, pp. 254 – 261.

46- **Madigan, Michael T.; Martinko, John M.; Stahl, David A. and Clark, David P. (2012):** Brock**,** Biology of Microorganisms (13th Edition). Pearson Education, Inc., San Francisco, CA., USA.

47- **Margulis, Lynn and Chapman, Michael. J. (2009):** Kingdoms & Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth (4th Edition). Elsevier Academic Press. London, UK.

48- **Okafor, N (2007):** Modern Industrial Microbiology and Biotechnology. Science Publishers, New Hampshire, USA.

49- **Osiewacz, Heinz D. (2002):** Molecular Biology of Fungal Development. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

50- **Pitt, J.I.; and Hocking, A.D. (Editors) (2009):** Fungi and Food Spoilage (3rd Ed). Blackie Academic & Professional, Boundary Row, London, UK.

51- **Prescott, Harley (2002):** Laboratory Exercises in Microbiology (5th Edition). The McGraw−Hill Companies. New York, USA.

52- **Prescott, L.M. Harley, J.P and Klein, D.A. (2002):** Microbiology. (5th Ed). The McGraw−Hill Companies. New York, USA.

53- **Richardson, Philip (Editor) (2001):** Thermal technologies in food processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

54- **Roberts, D. and Greenwood, M. (2003):** Practical Food Microbiology. (3th Ed). Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company, Oxford, UK.

55- **Robinson, R.K. (2002):** Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA.

56- **Robinson, R.K. (Editor) (1983):** Dairy Microbiology. (Volume 1), The Microbiology of Milk. Applied Science Publishers, London, England.

57- **Robinson, R.K. (Editor) (1983):** Dairy Microbiology. (Volume 2), The Microbiology of Milk Products. Applied Science Publishers, London, England.

58- **Samson, R. A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; and Filtenborg, O. (Editors) (1995):** Introduction to Food-Borne Fungi (4th Ed). Centraalbureau Voor Schimmel Cultures, Baarn, Netherlands.

59- **Schlegel, Hans G. (1993):** General Microbiology (17th Edition). Cambridge University Press. Cambridge, England.

60- **Sharma, R. (2006):** Chemical and Microbiological Analysis of Milk and Milk Products. International Book Distributing Co. Charbagh, Lucknow. India.

61- **Silva, D. N. ; Taniwaki, M. H.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Nascimento; M. D. S.; and Gomes, R. A. R. (2013):** Microbiological Examination Methods of Food and Water: A Laboratory Manual. CRC Press/Balkema, Taylor & Francis Group, London, UK.

62- **Smit, Gerrit (2003):** Dairy processing, Improving quality. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

63- **Talaro, Kathleen Park and Talaro, Arthur (2002):** Foundations in Microbiology (4th Edition). The McGraw−Hill Companies. New York, USA.

64- **Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. (1999):** Yoghurt, Science and Technology (2nd Ed). Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

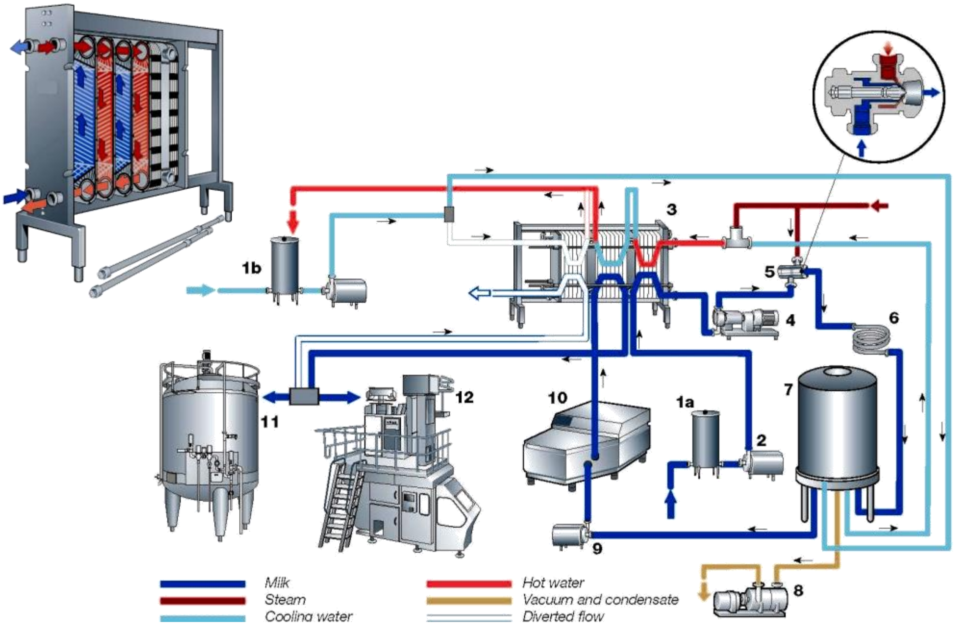
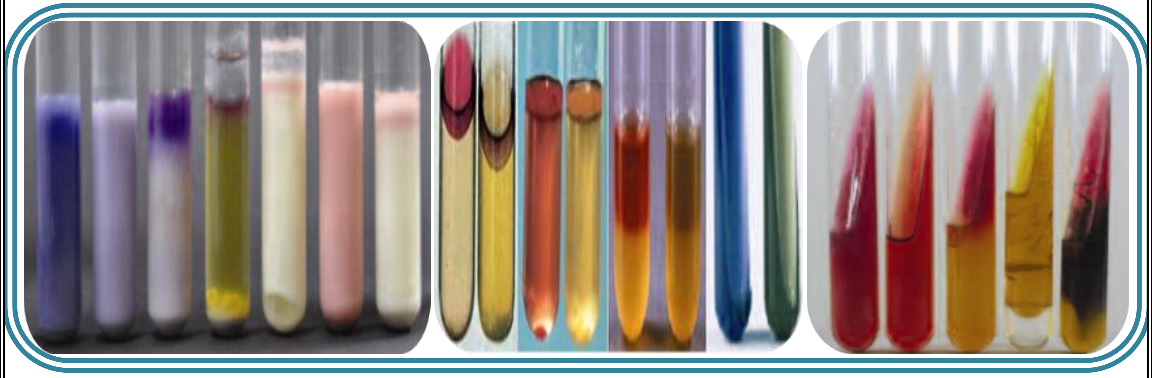
65- **Tortora, G. J.; Funke, B. R. and Case, C. L. (2010):** Microbiology, **An Introduction** (10th Edition). Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, USA.

66- **Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F. (1992):** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. (3rd Ed), American public Health Association, Washington, USA.

67- **Wehr, H.M. and Frank, J.F. (2004):** Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17th Edition), American public Health Association, Washington, USA.

68- **Wong, N. P.; Jenness, R.; Keeney, M.; and Marth, E.M. (Editors) (1999):** Fundamentals of Dairy Chemistry (3^{th} Edition). Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, USA.

تم بحمد الله

Food Microbiology

Associate Professor: Fahd A. Alsharjabi