Study of Bacteria That Contaminate and Forms Biofilm in Milk Containers

A thesis

Submitted to the Council of Science College
in University of Babylon
in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
in
Biology / Microbiology

By

Hawrra Whab Azize

March 2004

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿وَإِنَّ لَكُم في الأنَعَمِ لَعِبرَةً نُّسقِيكُم مّمّاَ
في بُطُونهِ مِن بيَنِ فَرثٍ وَدَمٍ لَّبناً
خَالِصاً سَائِغاً لِلشرِبين﴾
١

صدق الله العلي العظيم
سورة النحل (الآية-66)

Summary

77 samples of raw cow milk were collected through the study periods of October 2002 to September 2003 from producer containers of collected and cooled centre/Babylon and from some producer homes in Hilla city.

172 bacterial isolates were isolated from 50 samples. The results were revealed that gram negative bacteria were predominant (57%) and the *E. coli* was prevalence (15.1%). The *Enterobacter, Klebsiella Pseudomonas, Aeromonas, Salmonella, Yersinia, Brucella*, *Alcaligenes* and *Neisseria* were also isolated (11.6%, 8.7%, 7%, 5.2%, 2.3%, 1.7%, 1.7%, 1.7% and 1.7%, respectively.). The gram positive bacteria were isolated at the ratio of 43% and the *Staphylococcus* was registered in high ratio (13.9%), followed by *Streptococcus, Micrococcus, Bacillus* and *Listeria* (12.8%, 6.4%, 5.3% and 4.6%, respectively.).

The log numbers of total plate count (TPC), coliform bacterial count (CPC) and staphylococci bacterial count (SPC) were ranged at the numbers of 6.43-8.16, 0-6 and 0-5.62 cell/ml, respectively. It was noted that there was significant effect of seasons on the TPC. The numbers of TPC were higher in hot months than in cool months, while wasn't found significant effects between the CPC and SPC during these periods. It was also found negative relationship between TPC and pH values in the same periods.

44 bacterial isolates were isolated from swabbing of two regions in experimental metal containers after 48 hours by using 20 samples. The results noted that the gram negative bacteria were predominant in biofilm formation (81.82%) and the *E. coli* was prevalence (20.5%), followed by *Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella, Neisseria, Citrobacter, Proteus* and *Shigella* (13.6%, 11.4%, 11,4%, 6.8%, 6.8%, 4.5%, 4.5% and 2.3%, respectively.). The gram positive bacteria were isolated at the ratio of 18.18% and the *Staphylococcus* was prevalence (11.38%) followed by *Bacillus* (6.8%).

The motile bacteria was amore prevalence in adhesion and biofilm formation than non motile bacteria and the TPC mean in these swabs was 6×10^4 cell/ml/cm^2 .

It was noted that there were positive relationship among the TPC mean at zero time and the mean which calculated after 24 and 48 hours. The results were revealed negative relationship among the TPC mean at zero time, 24 and 48 hours and among the pH values at zero time, 24 and 48 hours.

The mechanism of biofilm formation was studied on the submerged slides in milk experimental containers. 7 samples were used for studing of

adhesion of bacterial species. It was to determine the bacterial species that have ability for adhesion first and was found that the *E. coli*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* were the most species that have the ability to adhere first.

150 bacterial isolates were isolated and the ratio of *E. coli* and *Staphylococcus* was 25.3% and 20.67%, respectively, followed by *Enterobacter, Klebsiella, Pseudomonas, Salmonella, Brucella, Proteus* and *Citrobacter* which isolated at aratio of 15.35%, 12.67%, 12.67%, 4%, 4%, 2.67% and 2.67%, respectively. The gram negative bacteria were more predominant (75.3%) than gram positive bacteria (24.7%) while the motile bacteria were more prevalence than non motile bacteria in biofilm formation.

The ANOVA test was revealed that the time has significant effect on the log numbers of TPC. It was found that these numbers were increased gradationally from first slide taken at the zero time up to last slide which taken after 48 hours.

The results were indicated that the collected milk was contaminated with extending range of bacteria especially with gram negative bacteria and the biofilm was formed in these containers by gram negative and motile bacteria.

الخلاصة

جمعت 77 عينة حليب بقري خام في خلال المدة الدراسية الممتدة من تشرين الأول 2002 ولغاية أيلول 2003 من حاويات المجهزين في مركز جمع وتبريد الحليب/بابل ومن منازل بعض المجهزين له في مدينة الحلة.

عزلت 172 عزلة بكتيرية من 50 عينة وأظهرت النتائج أنّ العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام هي الأكثر تواجداً (57%) وكانت بكتريا *Escherichia coli* هي السائدة (15.1%) وعزلت أيضاً اجناس *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Pseudomonas*، *Aeromonas*، *Salmonella*، *Yersinia*، *Brucella*، *Alcaligenes* و *Neisseria* (11.6%، 8.7%، 7%، 5.2%، 2.3%، 1.7%، 1.7%، 1.7%، 1.7%و 1.7% على التوالي) تلتها العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام (43%) إذ سجل جنس *Staphylococcus* أعلى نسبة (13.9%) وعزلت أيضاً اجناس *Streptococcus*، *Micrococcus*، *Bacillus* و *Listeria* (12.8%، 6.4%، 5.3% و 4.6% على التوالي).

تراوح العدد البكتيري الكلي اللوغاريتمي وأعداد البكتريا المعوية وبكتريا *Staphylococcus* اللوغاريتمية بين 6.43-8.16 و0-6 و0-5.62 خلية/مليلتر على التوالي. اظهر التغاير الفصلي تأثيراً معنوياً في العدد البكتيري الكلي اذ وجد انه خلال الأشهر الحارة كان أعلى من الأشهر الباردة في حين لم تسجل فروقات معنوية بين أعداد البكتريا المعوية وبكتريا*Staphylococcus* خلال هذه المدة ووجد أنّ هنالك علاقة ارتباط عكسية بين العدد البكتيري الكلي وبين قيم pH.

عزلت 44 عزلة بكتيرية من إجراء عملية مسح لموقعين في داخل حاوية معدنية تجريبية بعد مرور 48 ساعة باستعمال 20 عينة. بينت النتائج أنّ العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام هي السائدة في تكوين الأغشية الحيوية (81.82%) وكانت بكتريا *E. coli* هي الأكثر تواجداً(20.5%) ثم جاءت بعدها اجناس*Enterobacter*، *Klebsiella*، *Pseudomonas*، *Salmonella*، *Neisseria*، *Citrobacter*، *Proteus* و *Shigella* (13.6%، 11.4%، 11.4%، 6.8%، 6.8%، 4.5%، 4.5% و 2.3% على التوالي) تلتها العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام (18.18%) وكانت أعلى نسبة هي لجنس *Staphylococcus* (11.38%) ثم جاء بعدها جنس *Bacillus* (6.8%). وجد أنّ البكتريا المتحركة هي السائدة في الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي اكثر من غير المتحركة وكان معدل أعداد البكتريا الكلية في المسحات المأخوذة هو 6×10^4 خلية/مليلتر/سم^2.

عند دراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا الموجودة في الحليب وجد ان هنالك علاقة ارتباط موجبة بين معدل العدد البكتيري الكلي المحسوب في مدة الصفر وبين ذلك المحسوب بعد مرور 24 و48 ساعة كما أظهرت النتائج وجود علاقة ارتباط عكسية بين معدل العدد البكتيري الكلي المحسوب في مدة الصفر وبعد مرور 24 و 48 ساعة وبين قيم pH .

درست ميكانيكية تكون الغشاء الحيوي على شرائح زجاجية مغمورة في حاويات الحليب التجريبية اذ استعملت سبع عينات في دراسة تتابعية التصاق العزلات البكتيرية المتواجدة في عينات الحليب وحددت العزلات البكتيرية الأكثر قدرة على الالتصاق. وجد أن *E. coli*، *Pseudomonas* و *Enterobacter* هي اكثر العزلات الملتصقة اولاً. عزلت 150 عزلة بكتيرية وكانت نسب بكتريا *E. coli* هي25.3% و *Staphylococcus* هي20.67% تلتهما اجناس *Enterobacter*، *Klebsiella*، *Pseudomonas*، *Salmonella*، *Bacillus*، *Proteus* و*Citrobacter* بالنسب 15.35%، 12.67%، 12.67%، 4%، 4%، 2.67% و2.67% على التوالي. كانت العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام هي الأكثر تواجداً (75.3%) من العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام(24.7%) في حين كانت البكتريا المتحركة هي السائدة على غير المتحركة.

بين فحص تحليل التباين ان للزمن تأثير معنوي في الأعداد البكتيرية الكلية اللوغارتيمية التي وجد أنها ازدادت تدريجياً من الشريحة الأولى المأخوذة في مدة الصفر الى الشريحة الثامنة المأخوذة بعد مرور 48 ساعة.

دلت النتائج على أن الحليب المجموع كان ملوثًا بمدى واسع من الانواع البكتيرية ولاسيما السالبة لصبغة كرام كما وجد أن الغشاء الحيوي قد تكون فى حاويات الحليب والبكتريا السائدة في تكوينه هي العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام والمتحركة.

الفصل الأول
Chapter one
1.المقدمة واستعراض المراجع
Introduction and Literature Review

1.1 مقدمة عامة General Introduction

يعد الحليب إفرازاً طبيعياً للغدة اللبنية في اللبائن فهو مهيؤ ليلبي الاحتياجات التغذوية لصغارها وذلك لاحتوائه على المغذيات الضرورية من ماء (87.3%) ودهن (4.2%) ولاكتوز (4.6%) وبروتين (3.25%) واملاح معدنية (0.65%) زيادةً على الأحماض الأمينية والفيتامينات وغيرها من المكونات الأخرى (ICMSF, 1998)، لذا فهو ذو قيمة غذائية عالية ووسطاً غذائياً أنموذجياً لنمو وتكاثر العديد من الأحياء المجهرية فيه التي بدورها تسبب التلف له ولمنتجاته.

يتعرض الحليب للتلوث بالأحياء المجهرية التي تمتد من البكتريا المتواجدة في الحليب مروراً بالبكتريا المحللة لبروتينه والمزنخة لدهونه الى البكتريا الممرضة والمنتجة للسموم مثل بعض أنواع البكتريا العائدة للعائلة المعوية Enterobacteriaceae وبكتريا *Pseudomonas*، *Alcaligenes*، *Micrococcus*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus* و*Listeria monocytogenes* (Abou-Donia and El-Soda, 1986; Halpin-Dohnalek and Marth, 1989c; Garbutt, 1997) مغيرة بذلك صفاته النوعية إذ إنّ بعض الأنواع تكون مقاومة لدرجة حرارة البسترة والبعض الآخر لها القدرة على النمو والتكاثر عند درجة حرارة الثلاجة (El-Said *et al.*, 1997).

يعتمد العدد البكتيري الكلي Total plate count (TPC) في الحليب الخام على مدى توفر الشروط الصحية خلال عمليات الإنتاج والخزن والتسويق ومن متطلبات الحصول على حليب عالي الجودة هو الحفاظ على تعداد بكتيري مطابقاً للمقاييس العالمية (Ingalls, 2000).

إن من المصادر الشائعة والمهمة في تلوث الحليب هي أدوات جمعه ونقله وخزنه وتداوله إذ إنّ عدم تنظيفها بشكل جيد يترك سطوحها رطبة لبعض الوقت (بسبب وجود بقايا الحليب) الأمر الذي يشجع على تكون طبقة رقيقة لزجة عليها تعرف بالغشاء الحيوي (Biofilm) الذي يصبح في تماس مع الحليب المار فوقه فيما بعد فيكون مصدراً لتلوثه ولانتشار الأمراض وأيضاً يقلل مدة صلاحية الحليب ومنتجاته (Deibel, 2000).

الغشاء الحيوي هو خليط معقد من الأحياء المجهرية المتجمعة والملتصقة على سطح رطب وبعض مكونات المنتوج ومواد متعددة خارجية Exopolysubstances (EPS) ذات منشأ مايكروبي ويتطور نمو الخلايا الملتصقة لتكّون مستعمرات مجهرية، ووجد إنه يتكون بشكل شائع على أدوات إنتاج الأغذية ويزيد تلوثها لأنه لا يزال بسهولة أثناء التنظيف فيكّون مواقعاً جيدة لالتصاق الجزيئات الغذائية والامساك ببكتريا إضافية ويسبب أيضاً التآكل ويقلل كفاءة انتقال الحرارة (Chmielewski and Frank, 2003).

تتجسد ماهية هذا الغشاء في نظرية حديثة الوجود تعرف بتحسس النصاب (Quorum sensing) التي تسيطر على بنائه من خلال التعبير الجيني لسيل من الجينات المسؤولة عن تكوينه وبالاستجابة لكثافة الخلايا على السطوح من خلال لغة تحاور جيني بين خلايا الأحياء المجهرية (Bassler, 1999). يعد الغشاء الحيوي مرحلة تطور للأحياء المجهرية إذ يمتاز بكونه حلقة مستقرة في دورة الحياة يبدأ بالنمو والنضج وأخيراً الانحلال والانتشار (O'Toole *et al.*, 2000a). يمتلك على المستوى التركيبي أشكالاً مختلفة متجانسة أو متباينه على شكل طبقة مستمرة أو قد يتخذ شكل العرهون تتخلله قنوات مائية تسيطر على التبادل الغذائي و الغازي فيه ويعد هذا الغشاء حاجزاً يقلل مرور المضادات الحيوية جاعلاً الأحياء المجهرية اكثر مقاومة لها وهو

المسؤول عن 60% من الأمراض التي تصيب الإنسان (Spoering and Lewis 2001; Sutherland, 2001).

وجد أنّ مكونات الحليب هي الأمثل في بناء هذا الغشاء كون بروتينه من العناصر المهمة في العمل كبادئ لالتصاق الأحياء المجهرية وتحمي ترسبات الحليب الملحية الأحياء المجهرية في داخل الغشاء، اصبح هذا الغشاء مؤخراً يشكل تهديداً كبيراً لمنتجات الحليب إذ يرتبط بالسطوح المعدنية مكوناً بؤرة لتلوثها بالأحياء المجهرية الممرضة والسامة والتالفة لها (Flint *et al.*, 1997a).

أما معالجته فتعتمد في الأساس على السيطرة على عملية التصاق الأحياء المجهرية والتأكيد على التنظيف الدقيق وتطبيق الشروط الصحية واستعمال طرائق ميكانيكية مثل الحك والقشط وأخرى كيميائية باستعمال منظفات حامضية وقاعدية لأزالته لاسيما في معامل الالبان (Flint *et al.*, 1997a&c).

تستعمل مركبات Peracetic acid، Hydrogen peroxide وChlorine في التخلص منه عن طريق إزالة المخلفات بالماء ثم بالمنظف ويتبعه غسل بالماء (Jessen and Lammert, 2001). توصل Ren وجماعته (2002) الى اكتشاف مركب حيوي ذي منشأ طحلبي اسمه Furanone وجد أنه فعال جداً في تثبيط نمو الغشاء الحيوي في البكتريا الموجبة لصبغة كرام من خلال تداخله مع التشفير الجيني لبناء هذا الغشاء.

2.1 البكتريا المتواجدة في الحليب الخام The Bacteria Present in Raw Milk

يمتلك الحليب قيمة غذائية عالية لذلك فهو يعد وسطاً مثالياً لنمو وتكاثر العديد من الأحياء المجهرية إذ يحتوي على معظم العناصر الغذائية كماً ونوعاً التي تمكنه من دعم الحياة المايكروبية المنتهزة للظروف الملائمة وتجعلها قادرة على النمو والتكاثر مسببة بذلك تغيرات في تركيبه الكيميائي والفيزيائي.

وثق الاكتشاف الأول للأحياء المجهرية في الحليب تأريخياً خلال القرن السابع عشر وكان ذلك على يد الراهب Kircher الذي وصفها على أنها ديدان لا ترى بالعين المجردة وبين أنّ لها دوراً كبيراً في إتلافه وقد وضح Pasteur في القرن التاسع عشر دور هذه الأحياء في إحداث تغير كيميائي وفيزيائي في الحليب (Jay, 1970).

لا يخلو الحليب المأخوذ تحت ظروف التعقيم من البكتريا إذ وجد أنه يحتوي على بكتريا تعود الى اجناس *Micrococcus*، *Staphylococcus* ، *Streptococcus* و *Escherichia* ويضاف لها حمل بكتيري من مصادر مختلفة مثل التربة والماء وغذاء الحيوان وفضلاته وجسمه وحاويات جمع ونقل الحليب ويضم هذا الحمل أنواعاً بكتيرية مختلفة منها *Bacillus*، *Alcaligenes*، *Pseudomonas* وغيرها (Garbutt, 1997). بينت الهيأة العالمية لمواصفات الأحياء المجهرية في الأغذية أنّ أول مصدر يزود الحليب بالبكتريا هو ضرع الحيوان الذي يعمل كمستودع يضم بكتريا مختلفة منها ويمكن في بعض الحالات الحصول على حليب خالٍ من البكتريا منتج من ابقار وارثة لصفات مضادة للوجود البكتيري (Matos *et al.*, 1991; ICMSF, 1998).

إنّ كمية هذه البكتريا ونوعيتها غير ثابتة إذ تتعرض للإضافة والحذف متأثرة بالظروف المنتج تحتها الحليب فقد أفاد Santos وجماعته (1981) أنّ نمو بكتريا *S. aureus* في الحليب وإنتاجها للأنزيمات والسموم المعوية يقلل مستوى البكتريا في الحليب في حين يؤثر نمو بعض الأنواع البكتيرية النشطة مثل *S. lactis* في كمية ونوعية هذه البكتريا من خلال استهلاك سكر اللاكتوز وخفض الرقم الهيدروجيني للحليب (Majewski, 1987; Prescott *et al.*, 1990).

وجد أنّ نشاط البكتريا المتواجدة في الحليب يمر في ثلاث مراحل تبدأ بنمو بكتريا المسبحيات التي تمتاز بقدرتها على استهلاك سكر اللاكتوز بسرعة اكبر من الأجناس الأخرى منتجة بذلك الحامض الذي بدوره يوقف نمو المجاميع البكتيرية الأخرى ويسمح بنمو الخمائر والاعفان المتحملة للحموضة العالية التي تحطم الحامض المتكون وتخفض الحموضة الى المستوى

الذي تنشط فيه البكتريا المهاجمة لبروتين ودهن الحليب مثل بكتريا Coliform، *B. cereus* و*Pseudomonas* (Prescott *et al.*, 1990).

ذكر Majewski (1987) و Huszenicza وجماعته (1997) أن لولا كون المعيار الصحي للحليب يرتكز على المحتوى البكتيري في الدرجة الأساس لكانت نسبة مكونات الحليب ذات أهمية منافسة للوجود البكتيري اذ تتواجد في الحليب بعض المكونات التي تكون وسائل دفاع مختلفة من خلال تقليلها لنشاط البكتريا المتواجدة فيه وتأثيرها في مقاومتها الحرارية مثل Lactoperoxidase، Thiocyanate، Leucocytes و أملاح غير ذائبة منها Phosphates، Chlorides وCitrates (Prakash and Kulkarni, 1986; Kornacki and Marth, 1989; Garbutt, 1997). من الجدير بالذكر أن بعض مكونات الحليب تعمل على حماية البكتريا أثناء الغلي إذ يتكون غشاء رقيق من البومين وكلوبيولين الحليب مع بقية مكوناته وبعض البكتريا التي يهدف الغلي الى التخلص منها ويتكون هذا الغشاء قبل الوصول الى درجة الغليان الحقيقية للحليب وبهذا يساهم في نمو وتكاثر البكتريا الموجودة فيه بعد تركه عند الدرجة الحرارية المناسبة لنشاطها (عبود وآخرون، 1991).

1. 3 نوعية و كمية البكتريا الملوثة للحليب الخام

Quality and Quantity of Contaminated Bacteria in Raw Milk

اهتم العاملون في مجال التصنيع الغذائي بوضع مواصفات عالمية لمختلف الأغذية من اجل رفع جودتها والمقياس الذي تم مراعاته في هذا المجال هو نوعية الأحياء المجهرية وعددها في الأغذية.

أشار عبود وجماعته (1991) الى أنّ الكثير من الدول وضعت المواصفات القياسية للحليب الخام التي وجد أنها تتأثر بالنوع الحيواني وبالظروف البيئية وأغلب هذه المواصفات خاصة بالحليب البقري. ذكر الباحث Kuczaj (2001) أنّ نوعية الحليب الخام تتأثر بالعوامل المتواجدة في بيئة الحيوان ومكان الحلب وخلص الباحث الى القول بأنّ المحافظة على نوعية عالية من الحليب الخام يعد هدفاً مهماً وصعباً بالنسبة للمجهزين وذلك لأنه يضمن لهم البقاء في سوق الالبان ذات المنافسة المتزايدة.

يعتمد الوقت المطلوب لحدوث تغيرات في الحليب على العدد الأولي ونوع البكتريا الموجودة فيه وإفرازاتها من الإنزيمات التي تؤثر فيه، توصلت العديد من الدراسات السابقة الى أنّ المعايير النوعية للحليب الخام تعتمد على TPC و عدد البكتريا المعوية واتفق على أنّ لا يتجاوز المعيار القياسي لـ TPC العائد للحليب الخام عن 10^5 خلية/مليلتر (Jay, 1970; Marth, 1978; Kuczaj, 2001) وإفادت الجمعية الأمريكية للصحة العامة أن لا يتجاوز المعيار القياسي للبكتريا المعوية عن 10 خلية/مليلتر.

بين Garbutt (1997) أنّ الحليب المنتج تحت ظروف جيدة يحتوي على اقل من 10^3 - 10^5خلية/مليلتر في حين تحت الظروف غير الصحية يكون العدد اكثر من 10^5 خلية/مليلتر. أضاف Mohamed وجماعته (1999) أنّ نوعية وكمية البكتريا المتواجدة في الحليب تحدد بعدة عوامل منها عمر الحيوان وحالته الصحية كونه مصاب أو غير مصاب بالتهاب الضرع (Mastitis) ونوع العامل المسبب وضراوته ودرجة التلف اللاحق بأنسجة الضرع. أعزى Kuczaj (2001) المعدل القليل لـ TPC (15.8×10^3 خلية/مليلتر) الذي حصل عليه في دراسة أجراها على 38 عينة حليب بقري خام مأخوذة من الحاويات المجمع فيها الحليب الى تطبيق الشروط الصحية والعناية البيطرية الكبيرة. وجد الباحثان Ellis و Meldrum (2002) أنّ TPC لـ 196 عينة حليب تراوح TPC بين 3×10^6 - 10^8 خلية/مليلتر.

لقد وجد في دراسات سابقة عديدة بأن الحليب يحتوي على أنواع كثيرة من البكتريا مثل *Pseudomonas*، *Alcaligenes* وأنواع أخرى عائدة للعائلة المعوية (Marth, 1978)، *Staphylococcus* (Halpin-Dohnalek and Marth 1990b; Abdulla *et al.*, 2002)،

(El-Gamal, 1997) *Aeromonas*، (Mckinnon *et al.*, 1988) *Streptococcus*، *Micrococcus*، *Proteus*، (Al-Thwani, 1994) *Klebsiellae*، *Shigella*، *E.agglomerans* و *E.aerogenes* (Jay, 1970) *Salmonella* Tibana *et al.*, 1987)*Y.enterocolitica* , (Goel *et al.*, 1970; Wenz *et al.*, 2001) Aggarwal and Srinivasan, 1986; Saleh) *B.cereus* ، (; El-Said *et al.*, 1997 *Brucella* (Bradshaw *et al.*, 1987; Zottola, 2001) *Listeria* ، (*et al.*, 1993 *melitensis* (Prescott *et al.*, 1990) وهذا يدل على انه بيئة ملائمة لنمو العديد من الانواع البكتيرية.

1. 3 . 1 مجموعة العائلة المعوية Enterobacteriaceae

تضم هذه المجموعة جميع البكتريا الهوائية والاختيارية اللاهوائية التي تعيش في الأمعاء وتكون عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز وانتاج حامض مع غاز ومن الأجناس الرئيسة العائدة لهذه العائلة هي *Escherichia*، *Enterobacter* و *Klebsiella* التي غالباً ما تتواجد في الحليب الخام ويعتمد مقدار وجودها بصورة رئيسة على الظروف المتبعة في إنتاج الحليب وعلى نموها خلال المدة الواقعة بين عملية الحلب ووصول الحليب الى المعمل ويدل وجودها فيه على احتمال حدوث تلوث برازي (Marth, 1978; Pamela, 1996). يعد Schardinger صاحب أول اقتراح باستعمال البكتريا المعوية ولاسيما *E. coli* كمؤشر للتلوث وانتقال الأمراض بالأغذية وكان ذلك في القرن التاسع عشر (Jay, 1970). أمّا الأجناس الأخرى العائدة لهذه العائلة الاقل تواجداً في الحليب فهي *Yersinia*، *Shigella*، *Salmonella*، *Proteus* و *Citrobacter* (Macfaddin, 2000).

أشارت نتائج البحث المنجز من قبل Hill و Shears (1979) الى أنّ هناك علاقة بين الأمراض التي تصاب بها الابقار ونظافة الحلمة قبل الحلب وبين تعداد البكتريا المعوية في الحليب إذ تبين من فحص 28 عينة حليب بقري خام أنّ أعداد *E. coli* و *Klebsiella* كانت بين 10^{6}- 10^{7} خلية/مليلتر وأضاف الباحثان أنّ هذه الزيادة قد تعود الى التهاب الضرع الناتج عن الإصابة بهذه البكتريا. اكد Hirvonen وجماعته (1999) إنّ عدد البكتريا المعوية الموجودة في الحليب يرتبط بشكل كبير بشدة الالتهاب.

لاحظ Goel وجماعته (1970) أنّ وجود بكتريا *E. coli* و *E. aerogenes* في الحليب الخام يعد اكثر خطورة من وجود بكتريا *S. aureus* في حين يكون اقل خطورة منها في منتجاته إذ وجد أنّ أعدادها تتناقص مع طول مدة الخزن لمنتجات الحليب ولكن تبقى المشكلة المتمثلة بإفرازها السموم المعوية (Enterotoxin) التي تكون ثابتة حرارياً.

قام Mckinnon وجماعته (1988) بحساب TPC وتعداد بكتريا *E. coli* في ثلاث مزارع فكانت نتائج TPC هي 3.2×10^{4}، 2.3×10^{4} و7.2×10^{3} خلية/مليلتر ونتائج تعداد بكتريا *E. coli* هي 53، 21 و41 خلية/مليلتر على التوالي. تتواجد البكتريا المعوية في الحليب الخام بنسب مختلفة إذ عزلت بكتريا *E. coli* بنسبة 4.69% من فحص 420 عينة حليب أغنام خام (Al-Graibawi *et al.*, 1985) وبنسبة 5.4% من فحص 37 عينة حليب بقري خام (El-Bably and Ali, 1997) في حين تواجدت بنسبة 4.9% و7.1% لبكتريا *E.coli* و*Klebsiella* على التوالي من فحص 674 عينة حليب بقري خام (Kuwajock *et al.*, 1999). عزلت بكتريا *E. coli* بنسبة 22.5% وبكتريا *Klebsiella* بنسبة 4.16% من دراسة 93 عينة حليب بقري خام (Abdulla *et al.*, 2002).

1 . 3 . 2 بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*

هي بكتريا موجبة لصبغة كرام وغير متحركة ولا تحتوي على محفظة وغير مكونة للأبواغ تتواجد بهيأة كروية مفردة أو مزدوجة على شكل مجاميع وتنمو في ظروف هوائية ولاهوائية اختيارية.

عزل Zemelman و Longeri (1965) 775 عزلة من Staphylococci وذلك عند فحص 798 عينة حليب بقري خام ووجدا أنّ منشأ بعض هذه العزلات كان بشرياً. أشار Walker و Harmon (1966) الى أنّ وجود هذه البكتريا في حليب الابقار الخام يزداد يوماً بعد يوم وأنّ سبب هذه الزيادة مرتبطة بمقاومة الجرثومة لبعض المضادات الحيوية المستعملة في علاج التهاب الضرع وأشارا الى أنه يفضل استعمال حليب ذي محتوى قليل من هذه البكتريا عند تصنيع الاجبان. توصل Koupal وDeibel (1978) الى ان وجود بكتريا *S. aureus* في الحليب الخام يمكن تقديره بالعد البكتيري الكلي في حين في منتجاته يفضل استعمال طريقة الكشف عن السموم المعوية وإنزيم Thermonuclease وذلك لأنه أثناء حرارة التصنيع يقتل عدد كبير من هذه البكتريا فيعطي تصور خاطئ عن كمية وجودها في المنتوج.

وجد من دراسة أجريت في البرازيل تضمنت جمع 78 عينة حليب بقري خام مأخوذة من حاويات المجهزين لحليب محلوب يدوياً أنّ العدد البكتيري الكلي كان بين 10^{4}-1.5×10^{7} خلية/مليلتر وتعداد بكتريا *S. aureus* كان بين3×10^{3} - 9.8×10^{5}خلية/مليلتر وبنسبة تواجد مقدارها 46.9 % (Santos *et al.*, 1981). أفاد Al-Graibawi وجماعته (1985) أنّ بكتريا *S. aureus* تواجدت بنسبة 50% في حين تواجدت بكتريا *S. epidermidis* بنسبة 25% عند فحص 420 عينة حليب أغنام خام.

امتاز الحليب في الآونة الأخيرة على غيره من الأغذية بكونه من اكثر البيئات التي تتواجد فيها هذه البكتريا (Bennet *et al.*, 1986). بين Otero وجماعته (1988) ان المستوى العالي لتواجد بكتريا *S. aureus* في الحليب البقري الخام وعدم الخزن الصحيح يزيد من مخاطر التسمم الغذائي نتيجة إفرازها سموماً معوية من نوع D وC في الحليب الخام ونوع A في منتجاته (Halpin-Dohnalek and Marth, 1989b). وجد أنّ نمو *S. aureus* في الحليب الخام افضل من نموها في منتجاته كالقشطة وذلك يعود الى قدرتها على إفراز إنزيم Lipase وهذه الفعالية تؤدي الى تثبيط نموها بعلاقة طردية مع نسبة الدهون الموجودة في الوسط النامية فيه إذ وجد أنّ عددها يزداد من 10^{3} خلية/مليلتر الى اكثر من 10^{7} -10^{8} خلية/مليلتر في الحليب بعد خزن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 °م والى اكثر من 10^{5} خلية/مليلتر عند درجة حرارة 25°م وبهذا استنتج أنّ هناك تأثيراً ازدواجياً لدرجة الحرارة ونسبة الدهون في نمو هذه البكتريا (Halpin-Dohnalek and Marth 1989a and 1990b).

توصل الباحث Langlois وجماعته (1990) الى أنّ المكورات العنقودية المعزولة من الحليب اكثر فعالية من مثيلاتها المعزولة من البشر عندما عملت موازنة بين 762 عزلة مأخوذة من حليب أبقار خام وبين 93 عزلة مأخوذة من البشر باستعمال 33 اختباراً كيموحيوياً.

عزلت بكتريا *S. aureus* بنسبة 12.8% من 37 عينة حليب بقري خام وبنسبة 32.6% من 674 عينة و نسبة 53% من93 عينة (El-: Kuwajock *et al.*, 1999: Abdulla *et al.*, 2002 (Bably and Ali, 1997

1. 3. 3 البكتريا الأخرى الملوثة للحليب الخام

Other Contaminated Bacteria of Raw Milk

يعد جنس *Pseudomonas* من المسببات الرئيسية لتعفن وزنخة الحليب إذا ما ترك عند درجة حرارة معتدلة نتيجة إفرازها لإنزيمات محللة للبروتين (Proteinase) والدهون (Lipase) في الحليب (Jay, 1970; Garbutt, 1997). توصف هذه الإنزيمات بأنها خارج خلوية ثابتة حرارياً (Heat stable extracellular enzymes) ووجد بأنها تقاوم حتى درجة حرارة 110-115°م وأظهرت النتائج التي توصلت اليها الدراسة ذاتها أنّ 70-90% من نماذج الحليب البقري

الخام تتواجد فيها هذه البكتريا (Adams *et al.*, 1975; Jackman *et al.*, 1985) في حين أفادت الدراسة التي أجراها Al-Graibawi وجماعته (1985) أنّ نسبة تردد *P. aeruginosa* في الحليب الخام كانت 1.56%. أضاف Abdulla و Musleh (1988) أنّ أهم مصادر تلوث الجبن بهذه البكتريا هو الحليب الخام إذ وصل TPC للحليب الخام الواصل الى معمل تصنيع الاجبان الى 9.6×10^9 خلية/مليلتر وتعداد بكتريا *Pseudomonas* الى 9.2×10^6 خلية/مليلتر. عزلت 184 عزلة بكتيرية في دراسة أجريت على 674 عينة حليب بقري خام تضمنت 16 عزلة من بكتريا *Pseudomonas* و61، 11 و14 عزلة تعود لافراد من اجناس Streptococci، *Bacillus* و*Proteus* على التوالي (Kuwajock *et al.*, 1999).

تعد بكتريا *Pseudomonas* من الاجناس السائدة في تلوث الحليب الخام ويرتبط وجودها بتلوث المصادر المائية في الحقل (Ingalls, 2000). أظهرت نتائج دراسة لـ Al-Thwani (1994) أنّ 30 عزلة بكتيرية عزلت من فحص 50 عينة حليب بقري خام وهذه العزلات ضمت الأنواع الآتية *P. aeruginosa*، *E. coli*، *K. pneumoniae*، *S.agalactiae* *S. aureus*، *S. dysenteriae*، *L. monocytogenes*.

استطاع Abdulla وجماعته (2002) من عزل *S. agalactiae* بنسبة 12.5% و عزل Ahmed وجماعته (1983) بكتريا *B. cereus* من الحليب البقري الخام والمبستر والجبن وبنسب 9%، 35% و14% على التوالي وأضافوا أنّ هذه البكتريا واسعة الانتشار في التربة والهواء.

أشارت دراسة أجريت من قبل Aggarwal وSrinivasan (1986) الى أنّ وجود بكتريا *B. cereus* في الحليب ومنتجاته يعد تلوثاً لهذه المنتجات ولمعرفة تأثير هذه البكتريا في الحفاظ على نوعية الحليب قسمت العينات على مجموعتين بحسب عدد بكتريا *B. cereus* المتواجدة في الحليب: مجموعة A التي ضمت العينات المحتوية على اقل من 100 خلية/مليلتر وبمعدل 18خلية/مليلتر من هذه البكتريا أمّا بخصوص TPC فوجد بمعدل 6.8×10^4 خلية/مليلتر، ومجموعة B التي ضمت العينات المحتوية على اكثر من 100 خلية/مليلتر وبمعدل 855 خلية/مليلتر من هذه البكتريا وTPC كان بمعدل 3.1×10^4 خلية/مليلتر ووجد أنّ بكتريا *B. cereus* تسبب تخثراً حلواً للحليب الخام.

يعد جنس *Aeromonas* من الجناس المتواجدة في الحليب إذ أشارت دراسة أجريت في مصر على 150 عينة حليب بقري خام ومبستر واجبان طرية (بواقع 50 عينة لكل نوع) أخذت من مزارع ومعامل واسواق مختلفة في مدينة المنصورة للتحري عن وجود هذه البكتريا باستعمال الطريقة الروتينية للعد القياسي بالأطباق وباستعمال أوساط غذائية اغنائية الى أنّ نسبة تواجد هذه البكتريا بالطريقة الأولى 5.3% أمّا في الطريقة الثانية فكانت النسبة 16% ودلت الطريقة الأخيرة باستعمال الأوساط الاغنائية على ان بكتريا *Aeromonas* ظهرت بنسبة 26%، 6% و16% في الحليب الخام والمبستر والجبن الطري على التوالي و كانت بكتريا *A. hydrophila* اكثر شيوعاً (46.2%) ثم *A. caviae* (29.5%) في الحليب البقري الخام (El-Gamal, 1997).

تتواجد بكتريا *Y. enterocolitica* بتردد عال غير مقبول عالمياً في الحليب الخام ومنتجاته وذلك بسبب قدرتها على التكاثر عند درجة حرارة التبريد زيادة على إفرازها سموم معوية ثابتة حرارياً وعزلت من الإنسان والحيوان ووجد أنها تسبب انتان الدم (Septicemia) والتهاب الأمعاء (Gastroenteritis) والتهاب المفاصل (Arthritis) ووجدت ذات الدراسة أن 21 عزلة بكتيرية من مجموع 34 عزلة عائدة لبكتريا *Y. enterocolitica* معزولة من الحليب البقري الخام أنتجت سموم ثابتة حرارياً (El-Said *et al.*,1997).

أشار Tibana وجماعته (1987) عند إجرائهم دراسة في البرازيل تضمنت 219 عينة حليب بقري خام و280 عينة حليب مبستر الى أنّ 37 عينة حليب خام و38 عينة حليب مبستر احتوت على هذه البكتريا وبنسب تواجد مقدارها 32.4% في الحليب البقري الخام و 41.5% في الحليب المبستر.

1 . 4 النشاط البكتيري في الحليب الخام Bacterial Activity in The Raw Milk

بينت الهيأة العالمية لمواصفات الأحياء المجهرية في الأغذية (ICMSF, 1998) أهمية البكتريا في الحليب الخام ومنتجاته وأوضحت بأنها تعرضه لمشاكل نوعية وصحية وحددتها في ثلاثة محاور هي إنتاجها نكهةً غير مرغوب فيها وتغيرات فيزيائية مثل تخثر ولزوجة وشدة هذه التغيرات تعتمد على مدى التحلل الإنزيمي البكتيري لبروتين ودهن وسكر الحليب واخيراً وجود مخاطر صحية نتيجة نمو البكتريا الممرضة وانتاجها للسموم في الحليب ومنتجاته.

1. 4. 1 مشاكل نوعية Quality Problems

يختلف نوع التلف الذي يحصل للحليب من جراء نمو البكتريا باختلاف درجة حرارته فعند ظروف التبريد تنشط البكتريا المحبة للبرودة التي تحلل الدهن والبروتين بشكل أساسي أما عند درجة حرارة الغرفة فتنشط البكتريا المنتجة للغاز والحامض (Bradshaw, 1992). ينتج هذا التلف من نمو بعض الأنواع البكتيرية العائدة الى Enterobacteriaceae، *Bacillus*، *Alcaligenes* و*Pseudomonas* التي لها القابلية على إفراز إنزيمات محللة للبروتينات والدهون. وجد أنّ أعداد البكتريا المحبة للبرودة التي تعطي رائحة غير مقبولة تكون مختلفة والسبب يعود الى الفروقات بين الفعالية الإنزيمية والمقاومة لدرجات الحرارة بين الإنزيمات وضمن الأنواع ومن الجدير بالذكر أن حليب الابقار يحتوي كمية لا بأس بها من إنزيم Lipoprotein lipase المسؤول عن التزنخ المائي (Hydrolytic rancidits) نتيجة تلامس حبيبات الدهون مع الإنزيم المذكور وهذه مشكلة تعاني منها مصانع الالبان بكثرة (Anderson, 1982a; Cousin, 1982; Fisher and Scott, 1997).

اتضح أنّ الفعالية الإنزيمية المحللة للبروتين التي يكون مصدرها *Micrococcus* و *Bacillus* في حليب الابقار الخام كانت اكثر من حليب الجاموس (Abou-Donia and El-Soda, 1986). أهمية هذه الإنزيمات تكمن في أنه على الرغم من قتل البكتريا المنتجة لها بالحرارة فإنها تنجو من التحطيم الحراري (Jackman *et al.*, 1985) وتؤدي دورها في تحطيم الدهون وتكوين أحماض دهنية قصيرة السلسلة مسببة بذلك التزنخ في الحليب نتيجة نشاط إنزيم Lipase، وتحطيم البروتينات منتجة بذلك ببتيدات تعطي طعم مر في الحليب ومنتجاته بتأثير إنزيم Proteinase وفي كلتا الحالتين يحدث التلف في المنتوج وتقلل صلاحيته ويوجز هذا التلف بالرائحة غير المرغوب فيها وطعم يوصف بأنه معدني مر وقذر.

أشار كل من Aggarwal وSrinivasan (1986) وSaleh وجماعته(1993) الى أن وجود بكتريا *B. cereus* يسبب تحلل بروتينات الحليب وهذا الوجود يعد مهماً وإنْ كان ضئيلاً إذ يسبب تلفاً لايمكن تلافيه بالتسخين منتجاً مرارة وتجبناً حلواً في الحليب مسبباً بذلك خسائر اقتصادية. توصل Garbutt (1997) الى أنّ أعداد البكتريا المحبة للبرودة أو الحرارة المتوسطة إذا ما بلغت 10^7 خلية/مليلتر أو اكثر فإنّ كمية مهمة من الأنزيمات المحللة للدهون والبروتين سوف تؤشر في الحليب وعند نقل الحليب عند درجة حرارة أعلى من 7 °م فإنّ البكتريا المعوية والمسبحيات تقوم بتخمير سكر اللاكتوز مكونة حامض اللاكتيك مخفضة بذلك الرقم الهيدروجيني ومسببة تجلط البروتين وانفصال الشرش.

في خضم ما ذكر آنفاً فأنّ Ingalls (2000) قد أشار من موقع تأييد الى أنّ وجود البكتريا في الحليب الخام يسبب انحساراً لقيمته جاعلة منه اقل قبولاً من قبل المعامل والمستهلكين على حد سواء نتيجة تحطم مكوناته بفعل الإنزيمات المنتجة منها مسببة بذلك التعفن، التزنخ، المرارة وحموضة الطعم وأضاف أنّ الحليب وإنْ حفظ تحت ظروف تبريد فإنه لن يسلم من التلف البكتيري بفعل السموم والإنزيمات المنتجة فيه.

2. 4. 1 مشاكل صحية Hygienic Problems

إنّ قصة نشوء الأمراض المنقولة عن طريق الأغذية وأهمها الحليب ومشتقاته بدأت روايتها منذ عام 1880 عندما ثبت نقلها لأمراض خطيرة منها Brucellosis، Scarlet fever و Typhoid fever (Jay, 1970).

في الستينيات من القرن الماضي واجهت صناعة الأغذية في الولايات المتحدة مشاكل صحية ناتجة عن تلوثها ببكتريا *Staphylococcus* و*Salmonella* (Angelotti *et al.*, 1961; Thomas *et al.*, 1966) وجاء البحث المنجز من قبل Halpin-Dohnalek و Marth(1989c) مؤكداً على أنّ بكتريا *Salmonella* تحتل المرتبة الأولى من حيث الخطورة بعدها تأتي بكتريا *S. aureus*. شهدت هذه الحقبة تسجيل أبحاث عن العلاقة بين وجود بكتريا *S. aureus* في الحليب الخام وحدوث التسمم الغذائي المتأتي من استهلاك منتجاته (Walker and Harmon, 1966) اذ اتضح ان هذه البكتريا هي المسبب الأساسي للتسمم الغذائي الناتج عن تناول الحليب (Eden *et al.*, 1977).

في الثمانينيات من القرن الماضي أثمرت الدراسة التي قام بها Garcia وجماعته (1980) نتائج مهمة إذ وجدوا أنّ 7% من عزلات بكتريا *S. aureus* و*S.epidermidis* المستحصل عليها في هذه الدراسة كانت منتجة لسموم معوية نوع D وC و إنزيمات Proteinase، Phosphatase وThermonuclease (Stadhouders *et al.*, 1980). وجد Halpin-Dohnalek و Marth (1990a) أنّ إنزيم Lipase يساهم في تعزيز امراضية بكتريا *S. aureus*.

أشار Kuwajock وجماعته (1999) الى أنّ بكتريا *S. aureus* المقاومة للمضادات الحيوية المعزولة من الحليب تكون اكثر ضراوة عند استعمارها الإنسان. وجد Bradshaw وجماعته (1987) أنّ من مسببات الأمراض المتفشية عن طريق الحليب ومنتجاته هي بكتريا *L. monocytogenes* التي تسبب Listeriosis.

أعلنت الدراسات الوبائية في أنحاء مختلفة من العالم ولاسيما في البلدان النامية أنّ بكتريا *E. coli* من الممرضات الشائعة في الحليب والمسؤولة عن حالات الإسهال والتهاب الأمعاء تأتي بعدها من حيث الأهمية بكتريا *Klebsiella* و*Enterobacter* (Mehlman and Romero, 1982). انضمت بكتريا *Y. enterocolitica* الى قائمة الممرضات المنقولة عن طريق الحليب اذ تمكن Stern (1982) من عزل أنماط ضارية لهذه البكتريا من الحليب ووجد أنها مسؤولة عن التهاب الأمعاء وآلام في البطن وتقيئ وارتفاع درجة الحرارة والإسهال و قد أشار الباحث الى أنّ الحليب لايعمل كناقل لهذه البكتريا فقط ولكنه وسطٌ لنموها وتكاثرها وتتشابه هذه البكتريا مع *E. coli* من حيث إنتاجها سموم معوية ثابتة حرارياً. أشار Prescott وجماعته (1990) الى أنّ بكتريا *Salmonella* و *B.cereus* من الممرضات الموجودة في الحليب، إذ أكد Saleh وجماعته (1993) على إنّ بكتريا *B.cereus* المعزولة من الحليب الخام تسبب تسمماً مصحوباً بالإسهال والتقيئ من خلال إنتاجها السموم المعوية (مهدي، 2001).

تعد بكتريا *Aeromonas* المعزولة من الحليب الخام من مسببات التهاب الأمعاء لاسيما عند الأطفال مصحوباً بالإسهال وثبت أنها ممرضات أمعائية ذات خواص ضارية لإنتاجها سموم معوية وخلوية وإنزيمات محللة للدم وللبروتين (El-Gamal, 1997). أظهرت دراسة أجريت في اليابان أنّ اكثر من 14.700 مستهلك للحليب أصيبوا بالإسهال والتقيئ بعد شربهم له وعند متابعة مصدر الانتاج وجد أنه لا يتمتع بالشروط الصحية الرصينة ويبقى المنتوج لعدة ساعات تحت الشمس (Watts, 2000).

وضع الباحث Zottola (2001) الحالات المرضية الناتجة عن تناول الحليب في منحني كثير الشبه بمنحني نمو البكتريا، يبدأ الطور التمهيدي للمنحني في الستينيات ففي عام 1965 ظهرت 26 حالة إصابة ببكتريا *Salmonella* عن طريق تناول الحليب المسوق، بعدها جاء التفشي الحاصل في عام 1985 الذي ضم 200.000 حالة إصابة ببكتريا *Salmonella*

و*Listeria* المقاومتين للمضادات الحيوية وتفشي عام 1994 الذي ضم 250.000 حالة إصابة ببكتريا *E. coli*، *Salmonella* و*Listeria* في الطور اللوغاريتمي وتوقع الباحث أنْ تصل الحالات الى مليون إصابة باستمرار هذا الطور.

1. 5 تأثير فصول السنة في المحتوى البكتيري للحليب الخام
Effect of Seasonal Variation on The Bacterial Contain in Raw Milk

تعد درجة الحرارة من العوامل التي تستغلها البكتريا عند النمو في الحليب وذلك لأن درجة حرارته عند الحلب تبلغ 37° م التي تكون مناسبة لنمو وتكاثر العديد من الأنواع البكتيرية إذ تزداد أعدادها عند حفظ الحليب بدون تبريد أو عند درجة حرارة الجو الاعتيادية و لاسيما في الفصول الحارة من السنة.

بين Nakae وجماعته (1978) أن لفصول السنة تأثيراً في التعداد البكتيري الكلي إذ توصلوا في دراسة أجريت في اليابان للمدة من نيسان (1976) ولغاية شباط (1977) الى أنّ أعلى تعداد كان في شهر تموز (1.2×10^{7} خلية/مليلتر) وأقله كان في شهر كانون الثاني (7.2×10^{4} خلية/مليلتر). في المجال ذاته أكد whang وCho (1981) على أنّ أعلى تعداد للبكتريا المحبة للبرودة كان خلال فصل الصيف (10^{6} خلية/مليلتر) واقله كان خلال فصل الشتاء (2.5×10^{5} خلية/مليلتر). أضاف Lee وجماعته (1985) في دراسة تمت في كوريا استغرقت خمس سنوات(1979-1983) أنّ نسبة رفض الحليب في الصيف خلال هذه المدة كان اكثر من الشتاء وذلك بسبب ارتفاع TPC خلال فصل الصيف.

ذكر كل من Abou-Donia وEl-Soda (1986) أنّ العدد الأبتدائي للبكتريا في الحليب يؤثر في عددها في منتجاته ولاحظا أنّ الجبن المصنع في منازل الفلاحين أثناء فصل الشتاء كان اكثر من فصل الصيف ورجح أنّ يكون السبب هو قلة TPC في الشتاء عند موازنته بذلك المحسوب خلال فصل الصيف. وجد أنّ فصول السنة لا تؤثر في كمية الحليب المنتج بشكل كبير كما يكون تأثيرها في نوعية وكمية تلوثه (Mohamed *et al.*, 1999) ومن جهته قلل Kuczaj (2001) من أهمية الفروقات التي تخلفها فصول السنة على TPC وذلك في دراسة أجراها في بولندا إذ وجد أنّ هناك تأثيراً طفيفاً أظهرته النتائج التي توصل إليها إذ كان اقل تعداد في الأشهر الباردة وبمعدل 10^{4} خلية/مليلتر وكان أعلى تعداد في الأشهر الحارة وبمعدل 3.1×10^{4} خلية/مليلتر. في حين استثنى Abdulla وجماعته (2002) بكتريا *E.coli* من معادلة التأثير الفصلي إذ تبين أنها متواجدة بشكل كبير في كل الفصول.

1. 6 مصادر تلوث الحليب الخام Contamination Sources of Raw Milk

عند كشف النقاب عن مصادر تلوث الحليب الخام وجد أنه بالرغم من كون الحليب المنتج من ابقار سليمة يحتوي على أعداد قليلة من البكتريا فانه يزداد تلوثاً من مصادر عديدة مثل ضرع الحيوان وجسمه وغذائه وأرضية الحقل والعاملين وأن لأدوات الحلب وحاوياته وأحواضه اثراً بارزاً في زيادة التلوث البكتيري.

لقد ساهم توسع استعمال المضادات الحيوية في المجالات البيطرية والزراعية في تعزيز مقاومة البكتريا لهذه المضادات وهذا يشكل خطراً حقيقياً عند وصول مثل هذه البكتريا الى الحليب الخام التي قد يكون مصدرها العاملين الحاملين لها.

1. 6. 1 التهاب الضرع Mastitis

تصاب الأنسجة اللبنية بالتهاب يمتاز بإفراز أعداد كبيرة من الخلايا الجسمية (Somatic cells) والعامل البكتيري المسبب ومن مسببات هذا الالتهاب هي بكتريـــا *S. S.aureus*

agalactiae، *E. coli*، *S. epidermidis* و *Pseudomonas* وفق ما نصت عليه الهيأة العالمية لمواصفات الأحياء المجهرية في الأغذية (ICMSF, 1998).

اتضح أنّ بكتريا *S. aureus* تتواجد بشكل متكرر في الأبقار السليمة وبغزارة في الأبقار المصابة بالتهاب الضرع وبنسبة 42% في الضرع السليم و90% في الضرع الملتهب و وجد أنّ العلاج الدوري بالمضادات الحيوية لالتهاب الضرع الناتج عن الإصابة ببكتريا *S. agalactiae* ينتج عنه تغير العامل المسبب الى بكتريا *S. aureus* المقاومة لهذه المضادات (Zemelman and Longeri, 1965).

اتفق كل من Eden وجماعته (1977) وWilson وRichards (1980) وAnderson (1982b) على ان بكتريا *S. aureus* هي المسبب الرئيسي لالتهاب الضرع. أشار Santos وجماعته (1981) الى إنّ من بين 1007 عزله نقيت من عينات حليب مأخوذ من أبقار مصابة بالتهاب الضرع السريري وتحت السريري كانت بكتريا *S. aureus* تحتل الصدارة بنسبة 30.5% فيما تقاسمت بكتريا Coliform و*S. agalactiae* النسبة المتبقية وبلغت نسبة بكتريا *S. aureus* في دراسة لـ Garcia وجماعته (1980) 39.9%. يتعرض الحليب الى اختزال في كميته واختلاف في نسب مكوناته أثناء هذه الإصابة (Majewski, 1987; Huszenicza *et al.*, 1997; Mohamed *et al.*, 1999) ومن المسببات الأخرى لالتهاب الضرع هي *Salmonella*، *Enterobacter*، *E.coli*، *S.flexneri*، *P.aeruginosa*، *K.pneumoniae* و*Bacillus* (Al-Thwani, 1994; Wenz *et al.*, 2001; Abdulla *et al.*, 2002).

في حين أضاف El-Bably وAli (1997) أنّ استعمال معقم Cyteal بنسبة 0.5% قبل وبعد الحلب في تعقيم الضرع مهم في اختزال أعداد البكتريا المتواجدة في الحلمة ومن ثم في الحليب المنتج اذ وجد أنه فعال ضد *S. aureus* و*S. agalactiae* ولكنه لم يؤثر في *E.coli* التي وجد أنها تزداد تعداداً في الحليب المنتج من ابقار مصابة بالتهاب الضرع (Hirvonen *et al.*, 1999).

1. 6. 2 العاملين Workers

أخذت البكتريا الملوثة للحليب منعطفاً خطيراً عندما وجد Kuwajock وجماعته (1999) أنّ البكتريا التي عزلت من حليب ابقار خام أظهرت مقاومة مزدوجة لعشرة مضادات حيوية وهي بكتريا *S. aureus*، *E.coli*، *Streptococcus*، *Bacillus*، *Klebsiella*، *Pseudomonas* وبنسب مقدارها 73%، 55.5%، 52.3%، 44.4%، 62.5% و66.6% على التوالي ونسبت هذه البكتريا الى منشأ بشري وصلت الى الحليب عن طريق العاملين. باستعمال التنميط العاثي وجد أنّ 25% من عزلات *S. aureus* المعزولة من الحليب ذات مصدر بشري (Al-Graibawi *et al.*, 1985). أضاف Tibana وجماعته (1987) أنّ وجود بكتريا *Y. enterocolitica* في الحليب يشير الى حدوث تلوث بفضلات الإنسان.

1. 6. 3 الحاويات Containers

تصبح الحاويات غير النظيفة المستعملة لعدة مرات في نقل وخزن الحليب مع الوقت بؤرة كبيرة لتلوث وجبات الحليب الجديدة وذلك لأنّ بقايا الحليب في هذه الحاويات تتحول الى طبقة لزجة يصعب إزالتها بالغسل العادي باستعمال الصابون والمنظفات وفي كل مرة تستعمل فيها الحاويات يزداد سمك هذه الطبقة لتصبح مرتعاً للبكتريا ولاسيما المكورات والعصيات وغيرها وتسمى هذه الطبقة بالغشاء الحيوي ومن البكتريا المستفيدة من هذا الغشاء هي بكتريا عائدة للعائلة المعوية ولاجناس *Micrococcus* و*Salmonella* (Garbutt, 1997; ICMSF, 1998).

اشار Matos وجماعته (1991) أنّ أرضية الحقل والهواء والغذاء وجسم الحيوان هي مصادراً لتلوث الحليب ووجد هذا الباحث أنّ القش الداخل في تغذية الأبقار كان مصدراً للتلوث ببكتريا *S. xylose* في حين كان جلد الحيوان مصدراً للتلوث ببكتريا *S. aureus*. وجد Ingalls (2000) أنّ الماء المستعمل في إنتاج الحليب كان ملوثاً ببكتريا *Pseudomonas* و*E.coli*

ووجود الأخيرة في الحليب يشير الى احتمال حدوث تلوث برازي (Mehlman and Romero, 1982). أضاف Mckinnon وجماعته (1988) أن تلوث الحليب يكون بالدرجة الأولى عند النقل ومن مصادر التلوث ذات الصلة هي جدار الحاويات والأحواض (Yoo and Chen, 2002) ووجد أنّ نظام الحلب اليدوي والظروف الصحية السيئة في حقول إنتاج الحليب تساهم في تعزيز التلوث البكتيري للحليب (Abdulla *et al.*, 2002).

1. 7 الغشاء الحيوي Biofilm

يوصف الغشاء الحيوي بانه مدن مجهرية تسكنها تجمعات من الأحياء المجهرية الملتصقة على سطح صلب ورطب تنمو فيه مكونة مستعمرات مجهرية (Microcolonies) التي تضم تجمعات لخلايا مجهرية عائدة لنوع واحد أو اكثر وتعد هذه المستعمرات الوحدة التركيبية والوظيفية للأغشية الحيوية التي توجد مغمورة في مواد عضوية مفرزة من الأحياء المجهرية المكونة لها وتوصف هذه المواد بأنها متعددة خارجية(Exopolysubstances (EPS متباينة في تركيبها ويمتاز هذا الغشاء بالرقة (Baillie and Douglas, 1999).

وصفه Wimpenny (2000) بأنه شرك تسقط فيه المجتمعات البكتيرية ويتواجد في بيئات مختلفة تتوفر فيها شروط خاصة كوجود سطح صلب، مغذيات كافية ورطوبة وتمتد هذه البيئات من سطح الصخورالى الأسنان والى حاويات وعلب الأغذية والسطح الداخلي لأنابيب توزيع الماء والأجهزة والأدوات الطبية. يطلق التجمع البكتيري على البكتريا في حالة الغشاء الحيوي و المستعمرات البكتيرية وغيرها من الظواهر إلا أن المقصود به هنا هو تكوين مجتمع يصل لحد التشبع يحدث في طور فاصل بين صلب وسائل و يمتلك تقنيات خاصة للارتباط كإنتاج EPS التي توفر له الحماية وتسهل التفاعلات الحاصلة في المجتمع وتقلل نسبة النمو وتزيد أو تقلل تنظيم فعل الجينات وتطيل عمر الغشاء الحيوي ووجد أن كمية EPS المنتجة من الخلية الحرة المعيشة قليلة عند موازنتها بالمنتجة من هذه المجتمعات (Donlan, 2002).

وجد كل من Allison (1998)، Jessen وLammert (2001) وZottola (2001) بأنه يحتوي على بكتريا غير متحركة ملتصقة على الأسطح ومطمورة في ارضية من مواد متعددة عضوية ذات منشأ بكتيري وغير عضوية. أضاف Zottola (2001) أنّ التجمعات البكتيرية داخل هذا الغشاء تكون على شكل كوة نمو (Growth niche) وهي مساحة تحتوي على كل متطلبات البكتريا وتسمح لها أنْ تتفاعل مع بعضها البعض في نفس البقعة ووجد أن هذا الغشاء يتكون بوساطة زيادة جهد التعبير الجيني. إنّ هذه المجتمعات تكون متنوعة وغنية ومستقرة اكثر من حالة التواجد بشكل بكتريا حرة (Reanney *et al.*, 1983).

تحدث للخلايا بعد الارتباط تغيرات أثناء الانتقال من خلايا حرة الى جزء من مجتمع معقد مرتبط على السطح وتنعكس هذه التغيرات في صفات البكتريا المظهرية بالاستجابة لأشارات بيئية، وقد يتكون هذا الغشاء على أسطح حية وغير حية (O'Toole *et al.*, 2000a; Davey and O'Toole, 2000) ويحتوي على خلايا حية وغير حية (Chmielewski and Frank, 2003). أن الوحدة التركيبية الأساسية في بنائه هي المستعمرات المجهرية التي تكون في البدء بسيطة منبسطة ثم بعدها تكون بشكل كرة (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000; Donlan, 2002) ويظهر هذا الغشاء سلوك تعددية الخلايا مع مستويات عالية من التنظيم (Ren *et al.*, 2002) ويزداد سمكه بزيادة الأنواع التي يضمها (Donlan, 2002).

تتكون EPS من سكريات متعددة وبروتينات ودهون فسفورية وأحماض نووية ولاكتينات وتصل كمية الماء فيها الى 97% وتمثل هذه المكونات الطبقة الأساسية للغشاء الحيوي (Sutherland, 2001) التي تعمل على حماية البكتريا وتركيز المغذيات وتبطئ النمو وتمنع أو تقلل حدوث الجفاف للخلايا أو مرور المضادات الحيوية وبهذا تجعل البكتريا مقاومة لها (Flint *et*

al., 1997a; Chmielewski and Frank, 2003). إذ إن EPS تتفاعل مع المضاد وتثبط مفعوله وتمنع دخول المفترسات مثل الاميبا وكذلك العاثيات (Costerton *et al.*, 1999).

لوحظ أنّ وجود اكثر من نوع بكتيري مكون للغشاء الحيوي ينتج EPS قوية وسميكة و وجود نوع بكتيري ينتج كمية كبيرة من هذه المواد يساهم في زيادة ثباتية نوع بكتيري آخر كما هو الحال في التواجد المتزامن لبكتريا *K. pneumoniae* و*E. aerogenes* وأيضاً في حالة وجود بكتريا *P. aeruginosa* مع بكتريا *E. agglomerans* (Sutherland, 2001).

1. 7. 1 نبذة تاريخية عن الغشاء الحيوي Historical View of Biofilm

وصفت البكتريا في أول اكتشافها بأنها حرة المعيشة وكونها مخلوقات متناهية الصغر عند قياسها بالمخلوقات الراقية وفي القرن السابع عشر لاحظ العالم Antony Van Leeuwenhoek بأن هنالك بقعاً متكونة على أسنانه فقام بقشطها وفحصها تحت مجهره البدائي فلاحظ أن "حييوانات صغيرة " كما سماها لها القدرة على تكوين مجتمعات ملتصقة مع بعضها البعض على السطح. تعد هذه البقع أول دلالة تاريخية على وجود الغشاء الحيوي وسُجلت بعدها في عام 1933 أول ملاحظة على هذا الغشاء عندما وجد Henrici أنّ الجزء الأكبر من البكتريا المائية لاتوجد حرة طافية في الماء ولكن تنمو مطمورة تحت أسطح لزجة وأشار الى مشكلة تآكل هياكل السفن نتيجة نمو هذا الغشاء عليها (Allison, 1998; Lee-Wong, 1994; Dobell, 1960; O'Toole *et al.*, 2000a; Donlan, 2002).

في عام 1943 نشر Zobell أول بحث تناول دراسة الغشاء الحيوي وانجذاب البكتريا المائية للارتباط بالسطوح (Pulcini, 2001) ووجد حديثاً أنها ترتبط بالدقائق العضوية وغير العضوية العالقة في المياه البحرية مكونة ما يعرف بثلج البحار (Davey and O'Toole, 2000).

ثبتت الدراسات الأخيرة أنّ 99.9 % من البكتريا الموجودة في الطبيعة تكون مرتبطة على السطوح (Murphy and Kirkham, 2002). وجد Wardell وجماعته (1983) أنّ السطوح الصلبة في الطبيعة تغطى بغشاء رقيق من الأحياء المجهرية التي تكون البكتريا هي السائدة فيها. على الرغم من مرور ما يقارب من 100 عام على ملاحظة هذه الظاهرة إلا انه الآن بدأت تفهم على المستوى الجزيئي إذ تعد نموذجاً لدراسة تطور الأحياء المجهرية وهي مرحلة تتصف بالثبوتية والاستقرارية في دورة الحياة لأنها تتميز بعملية بدأ النمو ونضج واستمرارية وتحلل، و هنا بدأ تحول الحديث من بكتريا لاترى بالعين المجردة الى مجتمعات بكتيرية لاترى بالعين المجردة تعيش في مدينة الغشاء الحيوي (O'Toole *et al.*, 2000a).

1. 7. 2 طرائق دراسة الغشاء الحيوي Methods of Biofilm Study

استعملت العديد من الطرائق لدراسة هذه الأغشية وطريقة تكونها إذ استعمل الباحثان Chao وRamsdell (1985) طريقة المزرعة المستمرة (عن طريق الحفاظ على تراكيز ثابتة من المغذيات بإدخالها بشكل مستمر وإخراج جزء من الوسط) لدراسة كيفية تصرف عزلتين من بكتريا *E. coli* هما GR101 وP127 عند تواجدهما المتزامن في نفس الوسط إذ إنّ إحداهما لها قدرة السيادة والالتصاق في حين الثانية لاتتمكن من ذلك ومع هذا فإنّ العزلتين التصقتا الى الجدار وبذلك استنتج الباحثان أنّ العزلة الثانية تمكنت من الالتصاق نتيجة دعم العزلة السائدة لها. استعمل Flint وجماعته(1997a&c) طريقة المسحة وتقدير العدد البكتيري الكلي وباستعمال تقنية Epifluorescens microscope وأيد كل من Jessen و Lammert (2001) استعمال المسحة في تقدير عدد البكتريا الموجودة في الغشاء الحيوي الملتصق على السطح.

أشار Marshall (1997) الى أنّ هناك العديد من الطرائق لدراسة هذا الغشاء في النظامين المستمر والثابت ومن هذه الطرائق استعمال Confocal Scanning Laser Microscope (CSLM)، Scanning and

ATP bioluminescence test ،Transmission electron microscope و المسحة وصبغة كرام وصبغات مشعة وصبغة Resazurin واستعمال شريحة زجاجية تغمر لبعض الوقت في وسط سائل في النظام الثابت وتفحص تحت المجهر الضوئي الاعتيادي والأنابيب الشعرية وأطباق Microtiters ومن اكثر البكتريا المدروسة كنماذج مكونة لهذه الأغشية هي *P. aeruginosa*، *E.coli*، *K. pneumoniae* و *E. aerogenes* (Davey and O'Toole, 2000; O'Tool *et al.*, 2000a; Wimpenny, 2000; Chmielewski and Frank, 2003).

درس Schmid وجماعته (2002) هذا الغشاء بعد أنّ حفز تكوينه بطريقة الزرع المستمر عن طريق تدفق العالق البكتيري عبر قناة و أدى هذا الى التصاق البكتريا وتكون هذا الغشاء على السطح الداخلي للقناة وباستعمال تقنية حديثة هي التصوير الصوتي (Photoacoustic technique) وجدوا انه يتكون من 85-95% ماء و10^{9}-10^{11} خلية/مليلتر و1-2% EPS .

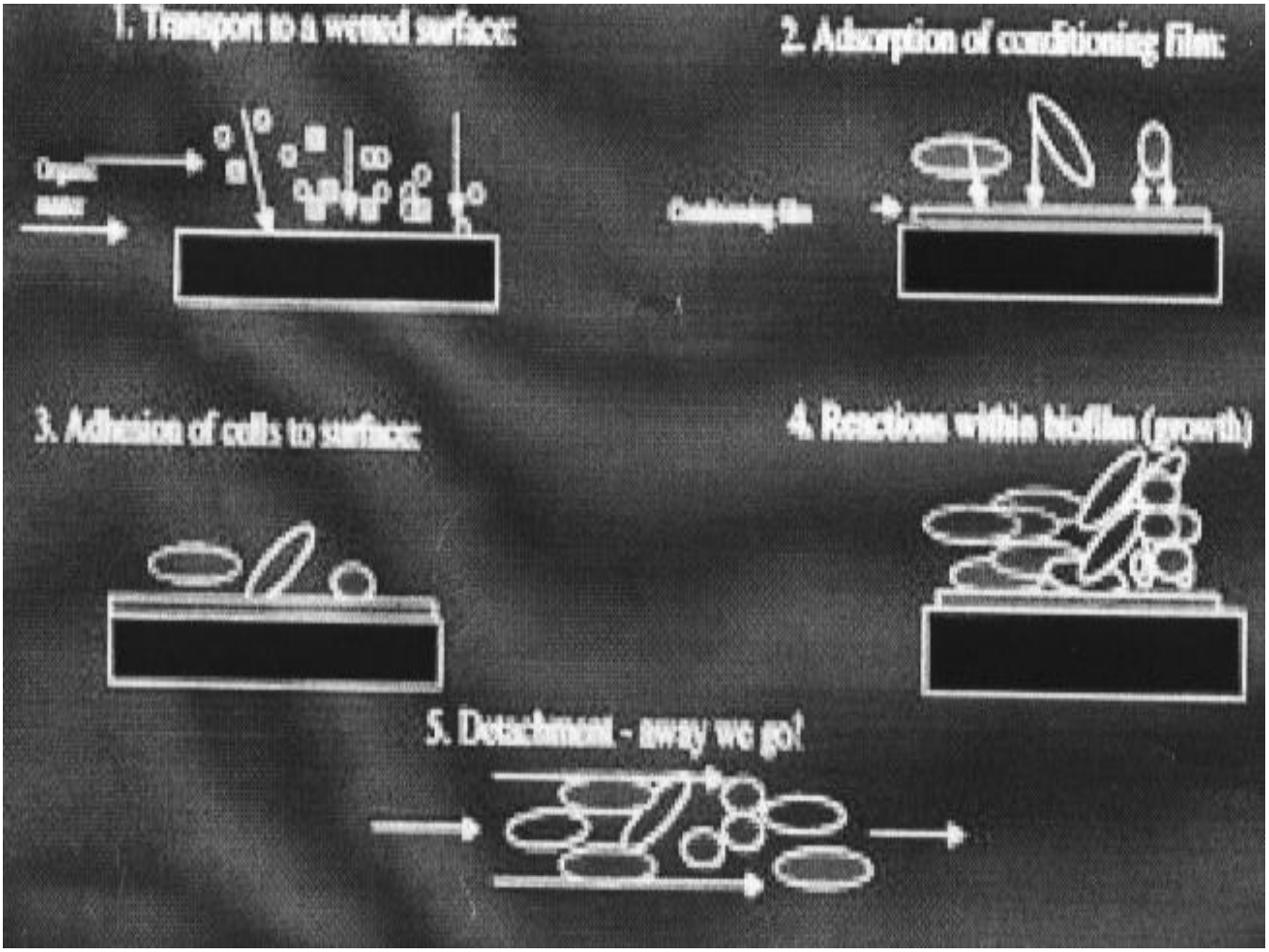
باستعمال طرائق كيميائية وجد Allison (1998) ان EPS تكون 90% من الغشاء الحيوي وساعدت الصبغات الخضراء والحمراء المشعة وتقنية CSLM المستعملة من قبل Tolker-Nielson وجماعته (2000) على معرفة دور الحركة في بناء هذه الأغشية باستعمال عزلتين من بكتريا *Pseudomonas* هما OUS82 و B13 إذ نميت كل عزلة على حدة فنتج مجتمع أحادي النوع ثم نميت العزلتان معاً فتكون مجتمع متعدد الأنواع ووجد ان في كلا الحالتين انتقلت البكتريا من مستعمرة الى أخرى . أما Lawrence وجماعته (1997) فاستعمل طرائق مناعية وطرائق تهجين وراثي لدراسة هذه الأغشية.

1. 8 ميكانيكية تكون الغشاء الحيوي Mechanism of Biofilm Formation

يضمن الغشاء الحيوي حدوث تغيرات في الشكل والوظيفة للبكتريا ويقوم بتنظيم مسارحياتها لذلك فإنه يعد مرحلة تطورية في علم البكتريا. تشمل عملية تكوين هذا الغشاء عدة مراحل توجز بأنها تبدأ بانجذاب الخلايا نحو السطح والتصاقها وبناء المستعمرات المجهرية وإنتاج EPS ومن ثم النضج (Chmielewski and Frank, 2003; Costerton *et al.*, 1999; Wardell *et al.*, 1983). اشار Zottola (2001) الى أن هنالك خمس مراحل متسلسلة في بنائه هي انتقال المغذيات العضوية وغير العضوية الى السطح الصلب وامتزازها وتكوين الغشاء المتكيف ومن ثم التصاق البكتريا بهذا الغشاء والنمو وحدوث فعاليات ايضية وأخيراً الانفصال والانتشار ويتم هذا بتفاعلات عكسية وغير عكسية (شكل-1).

يعتقد البعض أنّ تكوين هذا الغشاء يعود الى سيطرة سيل من الجينات على هذه العملية في حين يظن البعض الآخر أنها خاضعة لسيطرة تنظيم فيزيوكيمائي، ولكي لا تضيع حقيقة تكون هذا الغشاء وجد ان هنالك عواملاً جوهرية وغير جوهرية تتداخل في هذا البناء متحدة. تتمثل العوامل الجوهرية بجينات خاصة بالخلية نفسها تحدد شكلها وتكاثرها وتركيبها السطحي والزوائد الخارج خلوية وانتاج EPS والحركة والنشاط الأيضي في حين اللاجوهرية تشتمل على الصفات الفيزيوكيمائية التي تؤثر في فسيولوجية الخلية وانتقال المواد والانتشار، وتنضم الإشارات بين الخلايا الى القائمة الجينية التي تتكون بالاستجابة الى إشارات بيئية (Wimpenny, 2000).

أشار Marshall (1997) الى أنّ البكتريا هي أول المستوطنات للسطوح الصلبة ويعزز هذا الاستيطان بالالتصاق المستمر والنمو وتكوين غشاء ناضج وبين أنّ البكتريا المستوطنة هي التي لها القدرة على استغلال المغذيات المرتبطة على السطح والنمو الى الحجم الطبيعي والتكاثر ومن ثم الانطمار في EPS المفرزة منها وتكوين هذا الغشاء (Wardell *et al.*, 1983).



1. Transport to a wetted surface. 2. Adsorption of conditioning film.
3. Adhesion of cells to surface. 4. Growth with in biofilm.
5. Detachment-a way we go.

شكل -1: مراحل تكون الغشاء الحيوي عن Zottola (2001)

1. 8. 1 تكوين الغشاء التكيفي Conditioning Film Formation

هنالك قبول عام بأن السطوح الصلبة النظيفة سرعان ما تغطى بغشاء تكيفي مكون من جزيئات عضوية ولاعضوية تسهل ارتباط البكتريا لهذه السطوح وتستغرق هذه العملية ثوانٍ أو دقائق (Wimpenny, 2000; Donlan, 2002) وهذه الجزيئات تكون كبيرة أو صغيرة ذات صفات كارهة للماء مفرزة من كائنات حية أو ناتجة من تحللها تنجذب هذه الجزيئات وتمتز على السطح وتساهم في تبديل شحناته وطاقتة الحرة وتكون بمثابة مصدر مغذي عالي الطاقة للبكتريا الملتصقة (Marshall, 1997).

أكد كل من Flint وجماعته (1997c) وDeibel (2000) على أنّ بروتينات الحليب تفوق البروتينات الأخرى من حيث الأهمية في تكوين هذا الغشاء إذ إنها تكون كبوادئ لالتصاق البكتريا وتمسخ بعد ذلك لتجعل الارتباط غيرعكسي وتحتاج مكونات الحليب من 5 الى 10 ثوانٍ لكي تمتزووجد ان التصاق بكتريا *S. typhimurium* و*L. monocytogenes* يزداد بوجود هذا الغشاء و اشاروا الى أنّ النوع البكتيري المرتبط أولا يكيف السطح لالتصاق أنواع بكتيرية أخرى.

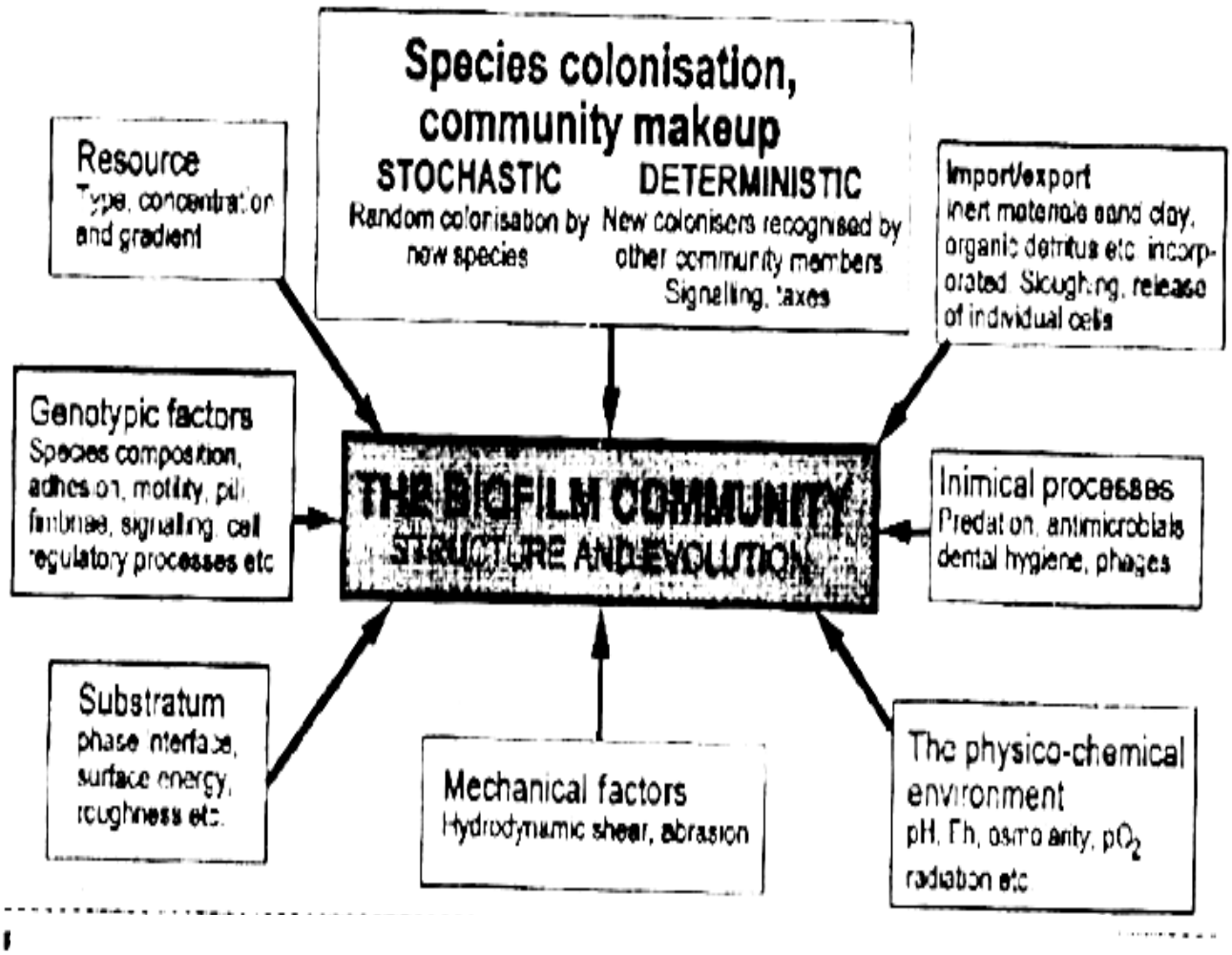
يساهم التنظيف باستعمال القواعد والحوامض في بعض الأحيان في بناء هذا الغشاء إذ يجعل السطح ذا خواص محبة للماء وعند تعرضه للهواء أو الماء يصبح مؤكسد تلتصق عليه الرواسب العضوية مكونة الغشاء المتكيف (Chmielewski and Frank, 2003).

1. 8. 2 الارتباط Attachment

تكون الأحياء المجهرية في الطبيعة عادة على تماس مع السطوح الصلبة والحركة باتجاه السطح تكون ناتجة إما عن جريان السوائل أو حركة البكتريا أو كليهما معاً وعند الاقتراب تكون البكتريا عرضة للكثير من التفاعلات التي تمهد حدوث التصاق سريع وهذا الالتصاق قد يكون منفعل (Passive) أو فعال (Active) يقاد الأول بقوة الجاذبية الأرضية والانتشار وحركة السائل، في حين يحدث الثاني نتيجة وجود الاسواط والاهداب وبروتينات الالتصاق والمحفظة وشحنة الخلايا (Marshall, 1997; Flint *et al.*, 1997b).

تسمح الأسواط للبكتريا بالحركة نحو المكان المناسب للالتصاق ومن ثم تحصل تغيرات فسيولوجية لسطح الخلية مثل تكون الأهداب وتصنيع EPS وتجمع الخلايا ويحصل الالتصاق خلال مدة 5-30 ثانية وعلى مرحلتين عكسية وغير عكسية (Marshall *et al.*, 1971; Wardell *et al.*, 1983; Flint *et al.*, 1997b; Davey and O'Tool, 2000).

يتمثل الارتباط العكسي بتفاعل أولي ضعيف بين الخلايا والسطح تتوسطه أواصر Vanderwaals وقوى الاتزان الكهربائي وتفاعلات كارهة للماء واثناء هذه المرحلة تبقى البكتريا متحركة حركة ارتعاشية وتزال بسهولة بأي ضغط او جهد معتدل أماّ الارتباط غير العكسي فينتج



بعوامل أخرى مثل معدل النمو ووسط النمو ومدة التماس ودرجة الحرارة والبكتريا على الأغلب

تكون سالبة الشحنة كارهة للماء وتولد هذه الصفة تنافر بين السطح والخلية ولتجاوز هذا التنافر يقوى الارتباط بأواصر كيميائية مثل الأواصر الأيونية وبتراكيب خاصة بسطح الخلية مثل بروتينات الالتصاق والاسواط والاهداب و EPS (Davey and O'Toole, 2000) والحركة الارتعاشية والانزلاقية (Allison, 1998 ; Danese *et al.*,2000; Sutherland, 2001) وتعمل EPS كجسور رابطة بين الخلايا والغشاء المتكيف (Deibel, 2000) وساعدت دراسات المجهر الإلكتروني على توضيح ان هذه المواد تبقى على السطح بعد إزالة البكتريا ويشار لها بـ Foot prints وإنتاجها يكون بتنظيم جيني فقد توصل Wimpenny (2000) الى ان بكتريا *P.aeruginosa* تفرز EPS بعد الالتصاق بالسطح ووجد أنّ هناك بعض الجينات مسؤولة عن تصنيعها مثل *algC,algD,algU* و*lacZ* وأشار الى أهمية دور الاسواط في عملية الارتباط وذلك عندما لاحظ أنّ كل من بكتريا *E. coli* المطفرة التي لاتتحرك و *P. aeruginosa* الفاقدة للأسواط لا تستطيع الالتصاق.

إنّ بروتين الغشاء الخارجي Ag43 في *E. coli* مهم للالتصاق إذ يسهل التماس بين الخلية والسطح من جهة وبين الخلايا من جهة أخرى، وفي البكتريا الموجبة لصبغة كرام تكون البروتينات السطحية والمحفظة مهمة في عملية الالتصاق، ووجد أنّ جينات *ica* تشفر لصنع البروتينات الخاصة بالألتصاق في بكتريا *S.aureus* وان البكتريا عندما تتحسس لظروف بيئية معينة تتحفز للتحول من الحياة الحرة الى الارتباط على السطح وتختلف هذه الإشارات باختلاف الأنواع البكتيرية فبكتريا *P. aeruginosa* تكون الغشاء الحيوي تحت كل الظروف في حين بكتريا *E. coli* و *Vibrio cholerae* تتحفز لتكوين هذا الغشاء في البيئات شحيحة الغذاء ويؤثر الأوكسجين والرقم الهيدروجيني في عملية التكوين (O'Toole *et al.*, 2000a).

درس Flint وجماعته (1997b) الخصائص السطحية لأثنتي عشرة عزلة من المسبحيات وبينوا أهمية هذه الخصائص في الالتصاق على سطح المعادن فوجدوا ان شحنة الخلايا متغيرة وتكون في الغالب سالبة وان معاملة الخلايا بـLysozyme المحلل لسكريات سطح الخلايا لم يؤثر في الارتباط ولكن عند المعاملة بـ Trypsin المحلل لبروتينات سطح الخلية وجد ان هناك اختزال 100 مرة في عدد الخلايا المرتبطة ومن هذا استنتج أنّ البروتين مهم في عملية الالتصاق (Donlan, 2000) ووجدوا أنّ كمية EPS المنتجة من هذه العزلات كانت بين 0.17 -1.65 مايكروغرام /10 ^{8} خلية.

أشار Flint وجماعته (1997c) الى أنّ بروتينات الحليب تسهل عملية الالتصاق إذ وجد أنّ بكتريا *B. cereus* ترتبط بأكثر من 10 ^{4} خلية/مليلتر خلال 60 ثانية الى السطح المعدني في معامل الالبان ووجد أنّ *E.coli*، *L.monocytogenes*، *Pseudomonas*، *Micrococcus* وColiform تتمكن من الالتصاق أيضاً وتكون غشاء حيوي على السطح المعدني في هذه المعامل. تؤثر في عملية تكوين الغشاء الحيوي عدد من العوامل منها الاوكسجين والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة ومدة التماس والمغذيات المتاحة (Debus, 1995; Deibel, 2000; Donlan, 2002). صمم Bradshaw وجماعته (1996) دراسة عن تأثير التهوية في عملية بناء الغشاء الحيوي فوجدوا انه عند عمل خليط بكتيري من بكتريا هوائية وأخرى لاهوائية فإنّ الغشاء الحيوي للخليط يحمي البكتريا اللاهوائية من التأثير السمي للأوكسجين. توصل Atmaca وجماعته (2000) الى أنّ الطبقة اللزجة التي تكونها *Staphylococcus* في الغشاء الحيوي هي عامل ضراوة وتتكون في الظروف الهوائية بكمية اكبر من تكونها في الظروف اللاهوائية.

1. 8. 3 تكوين المستعمرات المجهرية ونضج الغشاء الحيوي

Formation of Microcolonies and Maturation of Biofilm

أشار O'Tool وجماعته (2000a) الى أنّ المستعمرات المجهرية في الغشاء الحيوي تتكون بعد ساعات قليلة من الالتصاق في حين أكد Chmielewski وFrank (2003) على أنها تتكون بعد الارتباط غير العكسي تحت الظروف الملائمة للنمو وهي ناتجة من ترافق تجمع ونمو

البكتريا و تكمل بإنتاج EPS وانجذاب بكتريا أخرى نتيجة الاتصال بين الخلايا الذي يعرف بعملية تحسس النصاب. وجد إنّ الغشاء الحيوي المتعدد الأنواع يكون اسمك واكثر استقراراً من ذلك المتكون من نوع بكتيري واحد (Reanney *et al.*, 1983; Allison, 1998; Sutherland, 2001).

أشار Wimpenny (2000) الى أنه بعد الارتباط يبدأ النمو وانتاج EPS وتطور البكتريا المرتبطة ستراتيجية لاستيطان المكان ابتداءً من مكان الالتصاق مشكلة بذلك بيئة خاصة بها ذات نفاذية مختلفة وتدعم EPS نمو وتكاثر البكتريا وبناء الغشاء الخلوي وتسمح بحصول تبادل غذائي وتحافظ على كثافة الخلايا وهندسة وحجم المجتمع(Marshall, 1997). تسمح الظروف المستقرة بحصول نمو كافي وتكتل كبير للخلايا مؤدية بذلك الى وصول الغشاء الحيوي الى تركيب منتظم الذي يكون بحالة نضج متكون من طبقة واحدة أو اكثر مغمورة في أرضية من EPS ويحتوي على قنوات مائية (Baillie and Douglas, 1999).

تحتاج هذه العملية مدة كافية لتتطور الى مرحلة النضج إذ إنّ المستعمرات المجهرية تزداد حجماً في البداية ثم تلتحم لتكون طبقة من الخلايا تغطي السطح (Wardell *et al.*, 1983 ; Costerton *et al.*, 1999). تتميز بكتريا الغشاء الحيوي الناضج بمقاومتها للمضادات الحيوية والأشعة فوق البنفسجية وزيادة التعبير الجيني والقدرة على التحطيم الحيوي وزيادة المنتجات الايضية الثانوية (Baillie and Douglas, 1999; O'Toole *et al.*, 2000a).

1. 8. 4 الانفصال Detachment

تعد عملية الانفصال إشارة لنهاية عملية بناء الغشاء الحيوي القديم وبداية عملية بناء غشاء حيوي جديد إذ تنفصل قطع صغيرة من الغشاء القديم وتنتقل الى مناطق جديدة تستعمرها وتبني فيها غشاء جديد.

هنالك عدة أسباب تبرر حصول الانفصال منها زيادة سمك الغشاء وقوى الضغط والشد والجهد واشارات جينية وإنزيمات والتآكل والانسلاخ (Davies *et al.*, 1998) وحركة السوائل وحدوث تغيرات داخل الغشاء (Deibel, 2000) بسبب قلة الأغذية أو نتيجة إفراز إنزيمات كما في *P.aeruginosa* (O'Toole *et al.*, 2000a). بين Sutherland (2001) ان إنزيم Protease المنتج من الخلايا في الغشاء الحيوي يقلل من تماسك EPS ويسبب الانفصال. قد يحدث الانفصال بسبب الظروف اللاهوائية المتكونة في اسفل الغشاء وذلك نتيجة الاستهلاك المتزايد للأوكسجين نتيجة ازدياد أعداد الخلايا في الغشاء فتتكون مناطق لاهوائية فيه تساعد على ظهور أنواع بكتيرية لاهوائية (Mittelman, 1998; Wimpenny, 2000).

وجد إنّ الأوكسجين يدخل الى الغشاء ولكن ليس الى مناطق عميقة فيه (Marshall, 1997) إذ إنّ المسامية في قمة الغشاء تكون بنسبة 89% وفي العمق تكون بنسبة 5 % في حين تكون نسبة الأوكسجين في الأعلى 90% وفي العمق 25% وتتكون نتيجة قلة المغذيات في اسفل الغشاء مجتمعات بكتيرية لاهوائية تنتج كميات كبيرة من الغاز غير الذائب والحامض اللذين يسببان ضعف تماسك الغشاء وانفصال أجزاء منه وأيضاً وجود زيادة أو نقصان في كمية الكاربون يحفز الخلايا على إفراز كميات كبيرة من EPS التي تكون كزوائد سهلة الانفصال(Chmielewski and Frank, 2003).

1. 9 الاتصال البكتيري Bacterial Communication

تمتلك البكتريا بنوعيها السالبة والموجبة لصبغة كرام لغة خاصة تستعملها للتخاطب وبناء المجتمعات تعرف بتحسس النصاب وهي عملية السيطرة على التعبير الجيني بالاستجابة لكثافة الخلايا إذ تتضمن عملية إنتاج إشارات خارج خلوية على شكل جزيئات تعرف بالمحثات الذاتية (Autoinducers)، ان التحسس لوجود التركيز الحرج الأدنى لهذه المحثات يكون بمثابة الضوء الأخضر لحدوث تغيرات جينية مشتملة بذلك مظهر وأيض الخلية بشكل يضمن لها القدرة على

النمو في المجتمعات ومن الفعاليات التي تسيطر على تنظيمها هذه العملية هي الفعاليات الفسيولوجية والضراوة والتعايش والتنافس والاقتران والحركة وتكوين الابواغ وبناء الغشاء الحيوي وبصورة عامة تستعمل البكتريا السالبة لصبغة كرام مركبات (Acyle-HSL) Acyle-homoserine lactones في حين تستعمل البكتريا الموجبة لصبغة كرام ببتيدات صغيرة كمحثات ذاتية(Davies *et al.*, 1998; Costerton *et al.*, 1999; Tolker-Nielsen *et al.*, 2000; Miller and Bassler, 2001; Ren *et al.*, 2002).

وضح Bassler (1999) لغة حوار البكتريا السالبة لصبغة كرام إذ وجد أنها تستعمل نظام LUX I-LUX R وتعتمد هذه اللغة على التشفير الدوري لهذا النظام، ويعمل LUX I كإنزيم مصنع للمحث الذاتي Acyle-HSL الذي بدوره ينتشر بشكل حر عبر غشاء الخلية الى الخارج وعندما يصل تركيزه في الخارج الى الحد الحرج يعود بنفس الطريقة الى داخل الخلية ويرتبط بمركب يشبه البروتين يعرف بـ LUX R والاثنان معاً يكونان معقد يحفز أو يكبح استنساخ الجين الهدف. يدخل هذا المحث الى داخل الخلية نتيجة كون تركيزه في الخارج اكثر من تركيزه في الداخل وبهذا يكيف الخلايا للنمو في المجتمعات.

أما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فتستعمل لغة تعرف بتحسس النصاب الببتيدية، إذ توجد في معظم هذه البكتريا منظومة معالجة مرتبطة بغشاء الخلية متكونة من عليبات رابطة لـAdenosine triphosphate تقوم بمعالجة الببتيد الصادر من الخلية الذي يعمل كمحث ذاتي يعرف Phermone وهذا الأخير بعد المعالجة يصبح خارج الخلية وبزيادة تركيزه يميز من قبل منظومة أخرى مرتبطة بغشاء الخلية وتنتقل الإشارة بالفسفرة الذاتية الى أنْ تصل الى الجين الهدف فتقوم بكبح أو تحفيز استنساخه وتستعمل هذه اللغة من قبل بكتريا *B.subtilis*، *S.aureus* و *S.pneumoniae* وغيرها (Bassler, 1999; Novick and Muir, 1999).

وجد Bassler وجماعته (1997) و Singleton (1997) أنّ بكتريا *V.fischeri* تنتج Acyle-HSL يعرف بـ Bioluminescence وهو ضوء اخضر مزرق تخضع كميته المنتجة لتنظيم تحسس النصاب ووجد أنّ هذه البكتريا عندما تنمو بكثافة عالية تزداد كمية هذا الضوء أمّا في حالة نموها بشكل حر فتكون كميته قليلة جداً أو لاينتج مطلقاً.

تستعمل بكتريا *P.aeruginosa* نظامين للمخاطبة الأول هو Las R-Las I إذ تستعمله للسيطرة على الضراوة وفي تنظيم النظام الثاني Rhl R-Rhl I الذي ينظم إنتاج المؤيضات الثانوية ويعمل كلا النظامين بالاستجابة لـ Acyle-HSL. ان العزلة الطافرة التي لاتنتج هذا المحث لا تتمكن من تكوين غشاء حقيقي (Davies *et al.*, 1998; Wimpenny, 2000). أشار O'Toole وجماعته (2000b) الى ان التحول من العيش الحر الى المرتبط يكون بتأثير إشارات بيئية ووجد ان جين *crc* له اثر كبير في التعبير الجيني لبروتين سطحي في خلية *Pseudomonas* الذي له أهمية في تكوين الغشاء الحيوي.

استطاع Donlan (2002) من تحديد الجينات المتغيرة في هذه العملية فوجد أنّ 22% من الجينات يزداد تنظيمها و 16% من الجينات يقل تنظيمها وهناك زيادة كبيرة في تنظيم جين *algC* المسؤول عن تكوين EPS وبين ان عملية الاقتران داخل حدود الغشاء تحدث بدرجة اكبر مما في الخلايا الحرة وعلل ذلك بقرب الخلايا من بعضها البعض وأيضاً تكون محمية من التأثيرات البيئية وبذلك يحدث التغاير الجيني وظهور تعددية المقاومة للمضادات الحيوية.

1. 10 نماذج الغشاء الحيوي Biofilm Models

وصف الغشاء الحيوي من قبل العديد من الباحثين وباستعمال طرائق حديثة جداً واتفق اغلبهم على ثلاث نظريات لتفسير شكل وتركيب هذا الغشاء.

1. أحادي الطبقة: هي أول نظرية وضعت لتفسير تركيب الغشاء الحيوي وتفترض هذه النظرية كون هذا الغشاء مستمراً بشكل طبقة واحدة أملس مسطح ومتجانس.

2. تشير النظرية الثانية الى أنّ الغشاء الحيوي يكون متعدد الطبقات ثلاثي الأبعاد بشكل طبقة مستمرة غير متجانسة التركيب.
3. وجدت النظرية الثالثة بالاعتماد على نتائج CSLM إذ وصف الغشاء الحيوي على أنه يتخذ شكل العرهون ويحتوي على قنوات مائية وتفترض هذه النظرية أنّ هذا الشكل يعود لكون الخلايا المحيطية نشطة النمو بحكم قربها من القنوات المائية أما الخلايا القاعية فتكون بطيئة النمو ووظيفة هذه القنوات تكون بمثابة جهاز دوران يقوم بنقل المغذيات والغازات(Allison and Sutherland, 1987; Baillie and Douglas, 1999; Sutherland, 2001; Zottola, 2001; Donlan, 2002).

1. 11 أهمية الغشاء الحيوي Biofilm Importance

تتأرجح أهمية الغشاء الحيوي بين مفيد تارة وضار تارة أخرى إذ أشار Mitchell (1993) الى أهميته في معالجة المياه الثقيلة وفي المعالجة الحيوية لمياه الشرب وإزالة التراكيز الواطئة من مواد التفسخ الحيوي ومن جانب آخر أكد Schmid وجماعته (2002) على ما ذكر آنفاً ولكنهم أشاروا الى انه يسبب زيادة في مقاومة الاحتكاك نتيجة تقليل قطر الأنابيب وخفض نوعية الماء ويسبب تلوثاً حيوياً في معامل الأغذية ونقل الأمراض وتآكل المعادن (Lee-Wong, 1994; Mittelman, 1998).

وتوصل Allison (1998) و Langley و Beveridge (1999) الى أهمية هذا الغشاء في ربط الفلزات وهذه الأهمية تؤهله للعمل في مجال العلاج الحيوي والتقنيات الحيوية إذ قام Langley و Beveridge (1999) بدراسة خواص الغشاء الحيوي المتكون من نمو *P.aeruginosa* الرابطة للفلزات باستعمال فلزات Fe، Cu، Au و La فوجد أنّ كل الفلزات ما عدا Cu قد ارتبطت بوساطة EPS المتكون من هذه البكتريا بكميات كبيرة فاقت تلك المرتبطة لسطوح الخلايا المفردة واستنتج ان هذا الغشاء يستطيع تكون ترسبات غير ذائبة غنية بالفلزات على سطح الخلايا المكونة له.

يمتلك هذا الغشاء فوائد ومضار صحية إذ إنه في الإنسان يستعمر بطانة القناة الهضمية وبذلك يثبط التصاق الممرضات ولكنه في الأغذية غير مرغوب به بسبب تقليله مدة صلاحية المنتوج ونقله للأمراض (Deibel, 2000). أشار Ren وجماعته (2002) الى انه يسبب مشاكل تآكل المعادن وأمراض ناتجة عن المقاومة للمضادات الحيوية. في دراسة لـ Pulcini (2001) وجد أن EPS يمنع دخول Ampicillin الى*K.pneumoniae* وأظهرت هذه البكتريا مقاومة لـ Ciproflaxin عشرة أضعاف مقاومة البكتريا الحرة له. اتفق O'Toole وجماعته (2000b) مع Davey و O'Toole (2000) على ان مقاومة البكتريا في هذا الغشاء للمضادات الحيوية تكون 100 مرة اكثر من البكتريا الحرة.

إنّ المقاومة الموروثة في بكتريا الغشاء الحيوي هي أساس الأمراض المزمنة إذ تنتج البكتريا الملتصقة مستضدات تنبه إنتاج أضداد نوعية لها إلا أن الأخيرة غير فعالة ضد هذه الخلايا لأنها عاجزة عن دخول الغشاء الحيوي ومن ثم فإن المعقدات المناعية المتكونة تهاجم الأنسجة المجاورة والعلاج المستعمل للحالة المرضية الناتجة يقضي على البكتريا الحرة في الجسم ولايتعرض للبكتريا المرتبطة وبعد انتهاء العلاج تعود مظاهر المرض من جديد نتيجة تحرر البكتريا من هذه الأغشية(Costerton *et al.*, 1999; Spoering and Lewis, 2001).

1. 12 العلاقة بين الغشاء الحيوي والحليب
The Relationship Between Biofilm and Milk

هناك العديد من المشاكل التي تواجهها معامل الالبان نتيجة تلوث الحليب عن طريق الغشاء الحيوي المتكون على السطوح المعدنية التي تكون في تماس معه إذ وجد أنّ الخلايا البكتيرية تهاجر من هذه الأغشية لتحدث تلوثاً في المنتوج (Yoo and Chen, 2002).

يطلق على الغشاء الحيوي المتكون في معامل الالبان بالغشاء الحيوي الصناعي إذ توفر بقايا الحليب المتروكة على سطوح الأدوات بعد التنظيف غير الكامل المغذيات الضرورية لنمو البكتريا وتجعل هذه السطوح رطبة لمدة من الزمن وبتوافر درجة الحرارة المناسبة للنمو البكتيري يتكون الغشاء الحيوي ونتيجة الاستعمال المستمر لهذه الأدوات يحدث تلوث للحليب إذ تحمي ترسبات الحليب الملحية على سطوح الأدوات البكتريا الملتصقة من تأثير المنظفات ووجد أنّ الغشاء المتكون في هذه المعامل يكون اكثر مقاومة للمنظفات من بقية الأغذية ويتكون بسرعة في معامل الالبان خلال مدة اقل من 12 ساعة ومن البكتريا المكونة للأغشية الحيوية في الحليب هيStreptococci، *Bacillus*، *Micrococcus*، *Salmonella*، *Pseudomonas*، *E. coli* و *Y. enterocolitica* ويوصف التلوث الحاصل بالأغشية الحيوية بالمتقطع إذ يحدث مترافقاً مع انفصال أجزاء من هذه الأغشية في حين يوصف التلوث الذي يكون مصدره الغذاء نفسه بالمستمر ويزود السطح الملوث بالغشاء الحيوي الحليب المار فوقه بأكثر من 10^6 خلية/مليلتر (Flint *et al.*, 1997c; ICMSF, 1998; Zottola, 2001).

توصل Flint وجماعته (1997b) الى أنّ نوعية الحليب ومنتجاته هددت في الآونة الأخيرة بوجود الغشاء الحيوي في أدوات الإنتاج الحقلية والصناعية ووجد Flint وجماعته (1997a) انه في معامل الالبان يكثر وجود البكتريا المحبة للبرودة على صفائح التبادل الحراري المستعملة في بسترة الحليب مثل بكتريا *Streptococcus bovis*. يقلل هذا الغشاء صلاحية المنتوج ويسبب انتقال الأمراض وتعد الأدوات والسطوح المعدنية المنظفة بشكل غير كامل مصدراً لتلوث الحليب (Kumar, 1998; Deibel, 2000; Schmid *et al.*, 2002). أشار Lee-Wong (1994) الى انه في معامل الالبان تتكون طبقة من بروتين ودهن الحليب على سطوح الأدوات وهذه الترسبات تحتوي على النبيت الطبيعي للحليب وبكتريا *L.monocytogenes* (Yoo and Chen, 2002). وجد ان بكتريا *Bacillus* تكون الغشاء الحيوي على الصفائح الصناعية ولاسيما بكتريا *B.cereus* التي تقاوم الحرارة وتسبب تسمم غذائي وتحتاج 22 ساعة لكي تكون الغشاء الحيوي في معامل الالبان ويعتمد هذا التكون على وجود مستوطنات أولية مثل *K.pneumoniae* و *E.agglomerans* (Kolari *et al.*, 2001).

1. 13 معالجة الغشاء الحيوي Bioflim Treatment

إنّ عملية التنظيف في معامل الالبان لاتزال محددة باستعمال المواد الكيميائية الرخيصة التي لا تؤثر في إزالة الغشاء الحيوي فوضعت لذلك برامج خاصة للتأكد من إزالته نهائياً منها الغسل بالماء النظيف ثم التنظيف باستعمال(1.5%) Sodium hydroxide والغسل بالماء النظيف مجدداً وبعده يستعمل حامض النتريك (0.5%) ثم أخيراً غسل بالماء الحاوي على Sodium hypochloride (2000 ppm) ويمكن إزالة الترسبات القديمة بالتغير الدوري للمنظفات. إن المدة الزمنية المحصورة بين التنظيف واستعمال الأدوات تساهم في إعطاء فرصة لبناء هذا الغشاء والحل يكمن في تنظيف الأدوات قبل الاستعمال (Flint *et al.*, 1997c).

أشار Jessen و Lammert (2001) الى أنّ إزالة الغشاء الحيوي يتم باستعمال طرائق كيميائية وميكانيكية ومطهرات تحتوي على Peracetic acid، Hydrogen peroxide وChlorine وقد وجد الباحثان أنّ عملية إزالة المخلفات بالماء ثم بالمنظف وبعدها الغسل بالماء تكون كفيلة بإزالة هذه الأغشية.

وجد Chmielewski وFrank (2003) أنّ هنالك طرائق ميكانيكية منها الحك والقشط وكيميائية باستعمال منظفات لإزالة هذه الأغشية من السطوح الخشنة التي تكون أصعب تنظيفاً من السطوح الملساء وتتطلب عملية إزالتها تحطيم الأواصر الرابطة بين البكتريا والسطح وبين بكتريا وأخرى بفعل إنزيمات مثل Protease (Flint *et al.*, 1997b) ومعقمات ومنظفات كيميائية لإزالة الدهون والبروتين ومحاليل حامضية ومخلبية لإزالة ترسبات الحليب واستعمال مركبات الكلور و Halogens، Peroxygens ومركبات الأمونيوم الرباعية (Wistreich and

(Lechtman, 1980a). اشاربعض الباحثين الى أنّ Peracetic acid هو الأفضل في إزالة الغشاء الحيوي.

في حين توصل Ren وجماعته (2002) الى أن مركب Furanone المستخلص من طحلب *Delisea pulchra* فعال جداً في تثبيط نمو *B. subtilis* وتوقيف نمو الغشاء الحيوي في البكتريا الموجبة لصبغة كرام إذ انه بتركيز 40 مايكروغرام /مليلتر يقلل سمك الغشاء بنسبة 25% ويقلل عدد الخلايا بنسبة 63% وهو فعال ضد بكتريا *E. coli* و*S. aureus* وهذا يعد أول بحث يثبت خواص هذا المركب المضادة لتكون الغشاء الحيوي من خلال تثبيطه عملية تحسس النصاب لأن تركيبه مشابه للمحث الذاتي وبهذا يتداخل مع الإشارات الموجهة لأحداث تعبير جيني معين ووجد أنّ تركيزه هذا غير مؤذٍ لخلايا الثديات.

إنّ استعمال الماء عند درجة حرارة 180° م في التنظيف يساعد في تثبيت الغشاء الحيوي من خلال مسخ بروتينات الغشاء مما يجعلها اكثر إلتصاقاً للسطوح (Deibel, 2000).

وجد أنّ الاستعمال المزدوج للمضادات الحيوية مع مستوى واطئ من التيار الكهربائي يكون اكثر تأثيراً في السيطرة على تكون الغشاء الحيوي من استعمال المضادات الحيوية أو التيار الكهربائي كلاً على حدة وذلك من خلال تجربة أجريت على بكتريا *P. aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي باستعمال تيار مقداره 20 mA/cm^2 و Tobramycin بتركيز 10µg/ml (Jass *et al*., 1995). ذكر Cloete وجماعته (1998) انه عند استعمال المبيدات في أي نظام تشغيل يجب مراقبة مجموعة نقاط منها معرفة نوع الأحياء الواجب قتلها واختيار المبيد أوالمبيدات المناسبة بتراكيزها الصحيحة ومعرفة الوقت العلمي الدقيق لإعادة إضافة المبيد وتحليل مجمل البيانات المستحصلة دورياً لمتابعة تأثير المبيد ومراقبة التصاق الخلايا بالسطوح ومنع تكون الطبقة الحيوية عليها.

1. 14 أهداف الدراسة Aims of Study

نظراً لما للحليب من اثر كبير في حياة الكائنات الحية وما له من تأثيرات صحية بسبب تلوثه بالأحياء المجهرية الممرضة والسامة والتالفة له والمكونة للأغشية الحيوية وبحدود اطلاعنا لا توجد دراسات مختصة تتعلق بدراسة الأغشية الحيوية المتكونة بفعل البكتريا في بلدنا العراق فقد هدفت هذه الدراسة الى:

1. عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لحليب الابقار والمكونة للأغشية الحيوية.
2. دراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا الملوثة للحليب.
3. دراسة ميكانيكية تكون الأغشية الحيوية تحت ظروف تجريبية ثابتة.
4. اقتراح السبل اللازمة لمعالجة عمليات تكون تلك الأغشية في حاويات الحليب.

الفصل الثاني
Chapter Two
2. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.2 المواد Materials
1.1.2 الأجهزة والأدوات Equipments and Tools

1. موصدة	Autoclave (Webeco, Germany)
2. ثلاجة	Refrigerator (Ishtar, Iraq)
3. حاضنة	Incubator (Gallenkamp, England)
4. جهاز تقطير	Distillar (Ogawa seiki, Japan)
5. فرن	Oven (Gallenkamp, England)
6. مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope (Olympus, Japan)
7. حمام مائي	Water bath (Memmert, Germany)
8. ميزان حساس	Sensitive balance (Sartorius, Germany)
9. جهاز قياس الرقم الهيدروجيني	pH-meter (Philips, Holand)
10. شرائح زجاجية	Slides (Meheco, China)
11. ماصات زجاجية	Pipettes (Volca, U.K.)
12.انابيب	Tubes
13. اطباق	Plates

2.1.2 التعقيم Sterilization
اعتمد على ما جاء في Bhattacharyya (1993) في تطبيق خطوات التعقيم.

1. التعقيم الرطب Moist Sterilization

عقمت الأوساط الزرعية والسوائل باستعمال الموصدة عند درجة حرارة121 °م وضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة باستثناء وسط غراء الشيكلا-السالمونيلا (*Shigella- Salmonella* agar)الذي عقم بالتسخين حتى الغليان لمدة 2-3 دقيقة (Difco, 1975).

2. التعقيم الجاف Dry Sterilization

استعملت الحرارة الجافة (Dry heating) بوساطة الفرن الحراري عند درجة حرارة 160°م لمدة ساعة واحدة لتعقيم الزجاجيات. اما ناقل لقاح الأحياء المجهرية (Loop) واعناق الدوارق والأنابيب الزجاجية فقد عقمت باستعمال لهب مصباح بنزن (Bunsen burner).

3. الترشيح Filteration

استعملت مرشحات غشائية (Membrane filters) ذات ثقوب قطرها 0.45 مايكروميتر (Sartorius, Germany) لتعقيم المواد التي تتلف بالحرارة (Singleton, 1997).

3.1.2 الأوساط الزرعية Culture Media
حضرت جميع الأوساط الزرعية استناداً الى تعليمات الشركة المجهزة لها والمراجع العلمية المعتمدة

(Difco, 1975 :Baron *et al*., 1990 ; Baron *et al.*, 1994: Stukus, 1997 : Macfaddin, 2000).

1.3.1.2 وسط الغراء المغذي Nutrient Agar (Oxoid)
2.3.1.2 وسط غراء الدم Blood Agar (Oxoid)
3.3.1.2 وسط غراء الجكليت Chocolate Agar (Oxoid)
4.3.1.2 وسط غراء الماكونكي MacConkey Agar (Oxoid)
5.3.1.2 وسط غراء المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar (Oxoid)
6.3.1.2 وسط غراء شيكلا-سالمونيلا(Oxoid) Agar *Shigella -Salmonella*
7.3.1.2 وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain-Heart Infusion Broth (Oxoid)
8.3.1.2 وسط المرق المغذي السائل Nutrient Broth (Fluka)
9.3.1.2 وسط غراء سيمون ستريت Simmon's Citrate Agar (Oxoid)
10.3.1.2 وسط غراء كلغلر والحديد Kligler's Iron Agar (Oxoid)
11.3.1.2 وسط غراء اليوريا Urea Agar (Oxoid)

حضر هذا الوسط بإضافة 10 مليلتر من محلول اليوريا المحضر بتركيز 20% بعد تعقيمه بالترشيح الى 100مليلتر من وسط غراء اليوريا الأساس Urea agar base (Oxoid) المعدل رقمه الهيدروجيني الى 6.8 والمعقم بالموصدة والمبرد الى 50 °م. بعد مجانسة الوسط وزع في أنابيب اختبار معقمة وترك ليتصلب بشكل مائل (Macfaddin, 2000). استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز Urease.

12.3.1.2 وسط مرق المالونيت السائل Malonate Broth (Difco)
13.3.1.2 وسط ماء الببتون Peptone Water (%1)

حضر هذا الوسط بإذابة 10غم من الببتون (B.D.H.) و5 غم من كلوريد الصوديوم NaCl (B.D.H.) في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي، بعدها وزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة (Macfaddin, 2000). استعمل هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا في إنتاج الإندول.

14.3.1.2 وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور السائل
Methyl Red-Voges Proskaur Broth (MR-VP)

حضر هذا الوسط بإذابة 7 غم من الببتون و5 غم من الكلوكوز (B.D.H.) و5 غم من فوسفات ثنائي البوتاسيوم الهيدروجينية اللامائية(K_2HPO_4 (B.D.H.) في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي وضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.9 بعدها وزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة (Macfaddin, 2000). استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات.

15.3.1.2 وسط الفنيل الانين Phenylalanine Agar

حضر هذا الوسط بإذابة 3 غم من خلاصة الخميرة Yeast extract (Difco) و2 غم من الفنيل الانين (B.D.H.) DL-Phenylalanine و1 غم من فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية اللامائية (Na_2HPO_4 (B.D.H.) و5 غم من كلوريد الصوديوم و12 غم من الغراء Agar-Agar (Mast) في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي. ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.3 ووزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة ثم ترك ليتصلب بشكل مائل (BBL, 1973; Collee *et al.*, 1996). استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على إفراز إنزيم Phenylalanine deaminase وتكوين Phenyl pyruvic acid من Phenylalanine.

16.3.1.2 وسط فالكو لإزالة مجموعة الكاربوكسيل السائل
Falkow Decarboxylase Broth

حضر هذا الوسط بإذابة 5 غم من الببتون و3 غم من خلاصة الخميرة و1غم من الكلوكوز

و 0.02غم من صبغة Bromocresol purple (B.D.H.) و5 غم من الحامض الأميني لايسين Lysine أو الارجنين Arginine (Fulka) في لتر من الماء المقطر وبعد ضبط رقمه الهيدروجيني الى 6.8 وزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة (BBL, 1973). استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على إزالة مجموعة الكاربوكسيل من الأحماض الأمينية آنفة الذكر.

17.3.1.2 وسط الأكسدة والتخمر Oxidation and Fermentation Medium

حضر هذا الوسط بإذابة 2 غم من البيتون و5 غم من كلوريد الصوديوم و0.3 غم من فوسفات ثنائي البوتاسيوم الهيدروجينية اللامائية و0.08 غم من صبغة Bromthymol blue (B.D.H.) و3 غم من الغراء في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي. ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.1 وعقم بالموصدة وترك ليبرد قليلاً، بعدها أضيف لكل 100 مليلتر من الوسط الأساس المعقم 10 مليلتر من محلول سكر الكلوكوز المحضر بتركيز 10% والمعقم بالترشيح، وزع الوسط بعدها في أنابيب اختبار معقمة (BBL,1973; Macfaddin, 2000). استعمل هذا الوسط للدلالة على قابلية البكتريا على استهلاك سكر الكلوكوز هوائياً أولاهوائياً.

18.3.1.2 وسط تخمر السكريات Sugars Fermentation Medium

يتكون هذا الوسط من:

1. الوسط الأساس Basal Medium

حضر هذا الوسط بإذابة 10 غم من البيتون و1غم من خلاصة اللحم Beef extract (Difco) و5 غم من كلوريد الصوديوم و0.018 غم من صبغة Phenol red (B.D.H.) و5 غم من الغراء في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7.5، بعدها وزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة وبرد الى درجة حرارة 50-45°م (Macfaddin, 2000).

2. محاليل السكريات Sugar Solutions

حضرت محاليل السكريات (كلوكوز D-glucose ومانيتول Mannitol وزايلوز Xylose ولاكتوز Lactose وتريهالوز Trehalose ومالتوز Maltose ومانوز Mannose وسوربيتول Sorbitol وسكروز Sucrose) بإذابة 10 غم منها في 100 مليلتر من الماء المقطر وأضيف لكل 100مليلتر من الوسط الأساس المعقم 10 مليلتر من محلول السكر ذا التركيز 10% المعقم بالترشيح ليكون التركيز النهائي للسكر 1% (Macfaddin, 2000). استعمل الغراء للكشف عن إنتاج الغاز من خلال وجود الفقاعات الهوائية المنتشرة في الوسط وبهذا أمكن الاستغناء عن استعمال أنابيب درهم (Durham's tubes).

19.3.1.2 وسط الحركة Motility Medium

حضر هذا الوسط بإذابة 3 غم من خلاصة اللحم و10غم من البيتون و5غم من كلوريد الصوديوم و4 غم من الغراء في لتر من الماء المقطر باستعمال الحمام المائي وضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.3 بعدها وزع الوسط في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة (BBL, 1973). استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة.

20.3.1.2 وسط الإدامة Maintenance Medium

حضر هذا الوسط من إضافة 15 مليلتر من الغليسيرول Glycerol (B.D.H.) الى 85 مليلتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل ليكون بتركيز 15% غليسرول، ثم وزع في أنابيب اختبار نظيفة وعقم بالموصدة (Feltham *et al.*, 1978). استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لمدة طويلة.

4.1.2 المحاليل والصبغات والكواشف Solutions, Stains and Reagents

1.4.1.2 المحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) Physiological Saline Solution

حضر هذا المحلول بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في كمية قليلة من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مليلتر من الماء المقطر وعقم بالموصدة (Cruickshank *et al.*, 1975; Wistreich and Lechtman, 1980b). استعمل هذا المحلول لتخفيف المزارع البكتيرية.

2.4.1.2 محاليل صبغة كرام Gram's Stain Solutions

حضرت محاليل هذه الصبغة كما ذكرفي Wistreich و Lechtman (1980b) و Bhattacharyya (1993). استعملت هذه المحاليل لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة تحت المجهر الضوئي.

3.4.1.2 كاشف الكاتليز Catalase Reagent

حضر هذا الكاشف بتركيز 30% بإضافة 30مليلتر من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الى 70مليلتر من الماء المقطر (Macfaddin, 2000). استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الكاتليز المحلل لبيروكسيد الهيدروجين.

4.4.1.2 كاشف الإنزيم المؤكسد Cytochrome C Oxidase Reagent

حضر هذا الكاشف آنياً تبعاً لطريقتي Kovaks (1956) وBradshaw (1992) وذلك بإذابة 1 غم من مادة (B.D.H.) *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride في 100 مليلتر من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة ومعقمة. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز.

5.4.1.2 كاشف كوفاكس Kovac's Reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 5غم من مادة(B.D.H.) P-dimethyl aminobenzyldehyde في 75 مليلتر من الكحول الاميلي باستعمال الحمام المائي عند درجة حرارة 50°م ثم برد وبعدها أضيف 25 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl بصورة تدريجية الى المزيج وحفظ في قنينة معتمة (Cruickshank *et al.*, 1975; Macfaddin, 2000). استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج الإندول.

6.4.1.2 كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent

ذكر في Macfaddin (2000) وCollee وجماعته (1996) أن هذا الكاشف يحضر بإذابة 0.1 غم من احمر المثيل (Fluka) في 300 مليلتر من كحول اثيلي (95%) ويكمل الحجم الى 500 مليلتر بالماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج حامض كناتج نهائي للتحلل الكامل للسكريات.

7.4.1.2 كاشف الفوكس بروسكور Voges-Proskaur Reagent

حضر هذا الكاشف بالاعتماد على ما جاء في Bradshaw(1992) و Macfaddin(2000) وكما يأتي:

1. كاشف الفانفثول Alpha-naphthol Reagent (5%)

حضر هذا الكاشف بإذابة 5 غم من مادة الفانفثول (B.D.H.) في 100 مليلتر من الكحول المطلق.

2. محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (40%)

حضر هذا المحلول بإذابة 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم (B.D.H.) في 100 مليلتر من الماء المقطر. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على التحليل الجزئي للسكريات.

8.4.1.2 كاشف كلوريد الحديديك $FeCl_3$ Reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 12 غم من كلوريد الحديديك (B.D.H.) في 2.5 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز HCl واكمل الحجم الى 100 مليلتر بالماء المقطر (Macfaddin, 2000). استعمل هذا الكاشف للتحري عن قابلية البكتريا على إفراز إنزيم Phenylalanine deaminase.

2.2 طرائق العمل Methods

1.2.2 النمذجة Sampling

تم خلال المدة الدراسية من تشرين الأول 2002 ولغاية أيلول 2003 جمع 77 عينة حليب بقري خام مباشرة من حاويات المجهزين في مركز جمع وتبريد الحليب في بابل ومن منازل بعض المجهزين. جمعت العينات بأحجام مختلفة بحسب متطلبات العمل البحثي.

1.1.2.2 عزل الجراثيم الملوثة للحليب البقري الخام

تم جمع 50 عينة حليب بقري خام بمقدار 25 عينة للأشهر الحارة و25 عينة للأشهر الباردة بحجم 10 مليلتر لكل عينة، اذ جمعت في أنابيب اختبار معقمة وذات أغطية محلزنة محكمة السد. نقلت العينات الى المختبر عند درجة حرارة منخفضة وذلك بوضعها في حافظة مبردة خلال مدة لاتتجاوز الساعة وأخضعت الى فحوصات بكتريولوجية للتعرف على المحتوى البكتيري للحليب. دونت الملاحظات فيما يخص اللون والرائحة ومدة الحلب وغيرها من الملاحظات وتم قياس الرقم الهيدروجيني للعينات بعد وصولها الى المختبر.

2.1.2.2 دراسة ميكانيكية تكون الأغشية الحيوية في حاويات الحليب

1. جمعت 20 عينة حليب لدراسة عملية تكون الأغشية الحيوية في حاويات الحليب ولدراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا في الحليب وكما يأتي:

1. جمعت العينات بحجم 1 لتر لكل عينة في حاويات معدنية معقمة ونقلت الى المختبر عند درجة حرارة منخفضة في حافظة مبردة.
2. عند وصول العينة الى المختبر وضعت في حاويات معدنية سعة 1 لتر معقمة ومحدد فيها مساحة 1 سم^2 لأكثر من موقعين وحضن الحليب عند درجة حرارة 30°م.
3. قدرت استمرارية نمو وتكاثر البكتريا بوساطة إجراء العد القياسي بالأطباق (Standard plate count) في مدة الصفر وبعد 24 و48 ساعة.
4. بعدها سكبت العينة وغسلت الحاوية بالماء المقطر ثلاث مرات لإزالة بقايا الحليب المتخثر. 5. درست الأغشية الرقيقة بوساطة المسحة استناداً لما جاء في دراسة لـFlint وجماعته(1997a) وJessen وLammert (2001) اذ جرت عملية مسح لموقعين من المواقع المحددة سلفاً داخل الحاوية وأخذت من كل موقع ثلاث مسحات اذ استعملت مسحة معقمة ومررت على مساحة 1 سم^2 مرة واحدة وبدون تكرار (Jessen and Lammert, 2000).
6. نقلت كل مسحة على حدة الى أنبوب يحتوي على 10 مليلتر من0.1% ماء البيتون ورج الأنبوب لنقل البكتريا العالقة بالمسحة الى ماء البيتون واجريت عملية التخفيف بالمحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) المعقم وزرع من التخفيف الملائم (Flint *et al.*, 1997a; Garbutt, 1997).
7. عدت المستعمرات وشخصت الأجناس المتواجدة وقيس الرقم الهيدروجيني للعينات على مدى المدد الثلاث.

2. جمعت 7 عينات حليب لدراسة ميكانيكية تكون الأغشية الحيوية ونوع وعدد البكتريا المكونة لها باستعمال النظام الثابت Static system (Marshall,1997Flint *et al.*, 1997a;) وتحت ظروف تجريبية ثابتة تمثلت فيما يأتي:

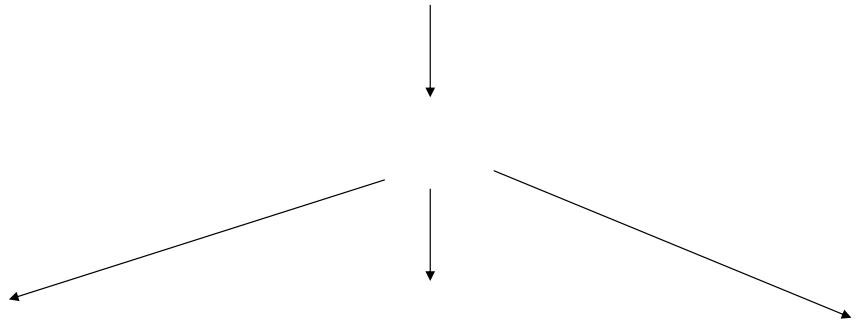
1. ثبتت 8 شرائح زجاجية في حامل زجاجي (Slide holder) ارتفاعه 2 سم وطوله 8 سم ويتسع لـ10 شرائح زجاجية وضع بدوره في حاوية معدنية سعة1 لتر وعقمت الحاوية بعدها أضيف الحليب بحجم 1 لتر الى الحاوية المعدنية وحضنت الحاوية عند درجة حرارة 30°م.

2. رفعت الشريحة الأولى من الحاوية في مدة الصفر من حضن الحليب بوساطة ملقط معقم وغمرت بالماء المقطر المعقم لمرة واحدة.

3. وضعت الشريحة المذكورة انفاً في دورق زجاجي حاوي على 20 مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) المعقم ورج الدورق بحدود 20 -25 مرة لإزالة البكتريا الملتصقة على الشريحة بعدها عملت سلسلة تخافيف وزرع من التخفيف المناسب.

4. أما فيما يخص الشرائح السبعة الباقية فقد تم رفع شريحة واحدة منها بعد 2، 4، 6، 24، 26، 28 و48 ساعة لعد البكتريا الملتصقة عليها بطريقة العد القياسي بالأطباق وبنفس الخطوات السابقة وشخصت الأنواع البكتيرية المتواجدة عليها.

5. استعملت بعض الشرائح لفحص الغشاء الحيوي تحت المجهر الضوئي وذلك بتجفيفها بالهواء وثبت الغشاء المتكون عليها بالتبخير بوضع الشريحة على دورق زجاجي فيه ماء مغلي لمدة 5 دقائق، ثم أضيف إليه زايلول(Xylole) لإزالة الحبيبات الدهنية ومن ثم أزيل الزايلول بالكحول ثم غسل الاخير بالماء المقطر وصبغت الشريحة بصبغة كرام (Marshall, 1997; Benson, 1998; O'Toole *et al.*, 2000a).



شكل -3: مخطط يوضح طرائق العمل

TPC

I

Stukus, 1997 ;) وذلك بعمل سلسلة من التخافيف لعينة الحليب. اخذ 0.2 مليلتر من التخفيف المناسب بوساطة ماصة زجاجية معقمة ووضع على سطح كل من وسط غراء الدم وغراء الماكونكي والغراء المغذي وغراء المانيتول الملحي ونشر باستعمال الناشر الزجاجي

(Spreader). زرع على هذه الأوساط بمقدار طبقان لكل عينة وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة وعلى غرار المستعمرات النامية بدأت الفحوصات التشخيصية حيث عملت للعزلات صبغة كرام والاختبارات الكيموحيوية التشخيصية.

2.2.2.2 حساب الوحدات المكونة للمستعمرات

Enumeration of Colony Forming Units

استعملت طريقة العد القياسي بالأطباق لحساب أعداد البكتريا الحية وذلك من خلال حساب أعداد المستعمرات الظاهرة على الوسط الزرعي في الطبق عندما كانت أعدادها بين 30-300 مستعمرة/طبق تمهيداً لحساب الوحدات المكونة للمستعمرات(خلية/مليلتر) في العينات المختبرة كما ذكر في Harris وSommers (1968) وStukus(1997) بحسب المعادلة آلاتية:

$$Number\ of\ CFU/ml = numberof\ colonies \times \frac{1}{dilution\ factor} \times plating\ factor$$

3.2.2.2 التشخيص Diagnosis

درست الصفات المظهرية للمستعمرات وقابلية اصطباغ الخلايا البكتيرية بصبغة كرام وأجريت بعض الفحوصات المذكورة في طرائق التشخيص القياسية والجداول التصنيفية المذكورة في كل من Holt وجماعته (1994) وSingleton (1997) وStukus (1997) و Macfaddin (2000) من خلال الأسس آلاتية:

1.3.2.2.2 الخصائص المظهرية والزرعية

Morphological and Cultural Characteristics

تم دراسة الخصائص المظهرية للخلايا البكتيرية من خلال ملاحظة طبيعة تفاعلها مع صبغة كرام وشكلها وانتظامها مع بعضها. درست الخصائص المظهرية والزرعية للنموات البكتيرية من خلال ملاحظة شكل المستعمرات ولونها وقطرها وشكل حوافها والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية (Differential media) كوسط غراء الماكونكي أو الأوساط الانتقائية Selective (media) كوسط غراء الشيكلا والسالمونيلا ووسط غراء المانيتول الملحي.

2.3.2.2.2 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

استعمل المزروع البكتيري النقي النامي على وسط الغراء المغذي بعمر18-24 ساعة لأجراء الاختبارات الكيموحيوية الآتية:

1. اختبار الكاتليز Catalase Test

نقلت كمية قليلة من النمو البكتيري بوساطة أعواد خشبية معقمة (Sterile applicator sticks) الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة ووضع فوقها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (30%). ان تكون فقاعات هوائية نتيجة تحرر غاز الأوكسجين من على النمو البكتيري المختبر دليل على ايجابية الاختبار(Macfaddin, 2000).

2. اختبار الإنزيم المؤكسد Cytochrome C Oxidase Test

وضعت عدة قطرات من كاشف (1%) *N,N,N′,N′*-tetramethyl-*p*-phenylene diamine dihydrochloride المحضر آنياً على ورقة ترشيح نظيفة وجافة موضوعة في طبق بتري معقم. نقل جزء قليل من النمو البكتيري الحديث بوساطة اعواد خشبية معقمة الى ورقة الترشيح المحملة بالكاشف. ان تحول لون النمو البكتيري الى اللون البنفسجي الغامق في خلال 10 ثوان يدل على النتيجة الموجبة للاختبار (Kovaks, 1956; Bradshaw, 1992).

3. اختبار الإندول Indol Test

لقح وسط ماء الببتون بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24-48 ساعة بعدها أضيف لكل أنبوبة 5 قطرات من كاشف كوفاكس ورجت الأنبوبة بهدوء. ان النتيجة الموجبة لهذا الاختبار هي ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط اذ تدل على انفصال جذر الإندول من الببتون (Cruickshank, 1975; Macfaddin, 2000).

4. اختبار احمر المثيل - فوكس بروسكور Methyl Red-Voges Proskaur Test

لقحت مجموعتان من الأنابيب الحاوية على وسطMR-VP السائل بالمزروع البكتيري وحضنت كلتا المجموعتين عند درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة للمجموعة الأولى و24 ساعة للمجموعة الثانية. بعد عملية الحضن أضيف للمجموعة الأولى من الأنابيب 5 قطرات من كاشف احمر المثيل. دل تحول لون الوسط من اللون الأصفر الشاحب الى اللون الأحمر على التحلل الكامل للسكر وإنتاج الحامض، في حين أضيف للمجموعة الثانية من الأنابيب 0.6 مليلتر من كاشف الفانفثول و0.2 مليلتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (40%). دل تحول لون الوسط من اللون الأصفر الشاحب الى اللون الكرزي بعد مرور 15-30 دقيقة على التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب Acetyl methyl carbonil (Collee *et al.*, 1996; Benson, 1998 ; Macfaddin, 2000).

5. اختبار إزالة مجموعة الأمين من الفنيل الانين Phenylalanine Deaminase Test

لقحت موائل غراء الفنيل الانين بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة. دل اللون الأخضر المتكون على السطح المائل بعد إضافة كاشف كلوريد الحديديك على النتيجة الموجبة المتمثلة بإفراز إنزيم Phenylalanine deaminase وتكون Phenyl pyruvic acid من Phenylalanine (BBL, 1973).

6. اختبار إنزيم اليوريز Urease Test

لقحت موائل غراء اليوريا بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة 37 °م وفحصت بعد مرور 4 و24 ساعة. النتيجة الموجبة هي تغير لون الوسط نتيجة إفراز إنزيم اليوريز من اللون الأصفر الى اللون الوردي (Macfaddin, 2000).

7. اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

اعتمد في إجراء هذا الاختبار على ما جاء في Stukus (1997) حيث لقحت موائل غراء سيمون ستريت بالمزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24-48 ساعة. تمثلت النتيجة الموجبة بتحول لون الوسط من اللون الأخضر الى اللون الأزرق ودل التغير باللون على قدرة البكتريا على النمو بوجود سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكاربون.

8. اختبار الحركة Motility Test

لقح وسط الحركة بالمزروع البكتيري بتقنية الطعن (Stab technique) في مركز الوسط وذلك باستعمال إبرة ناقلة معقمة وحضن عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة. دل انتشار النمو خارج محور الطعن وحدوث عكورة في الوسط على النتيجة الموجبة أي ان البكتريا متحركة، أما بقاء النمو في محور الطعن فانه دل على سالبية الاختبار. أعيد حضن الأنابيب ذات النتيجة السالبة عند درجة حرارة 25 °م لمدة 5 أيام لتأكيد صحة الاختبار (BBL, 1973).

9. اختبار تخمر السكريات وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين

H_2S Production and Sugers Fermentation Test

لقحت موائل غراء كلغلر والحديد بالمزروع البكتيري بتقنية الطعن والتخطيط باستعمال إبرة ناقلة معقمة وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة بعدها لوحظت التغيرات الحاصلة

في الرقم الهيدروجيني في القعر والسطح المائل ولوحظ التخمر بتغير لون كاشف احمر الفينول من اللون الأحمر الى اللون الأصفر. ان تكون الغاز غالباً ما لوحظ على شكل فقاعات اسفل الوسط أما البكتريا المنتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين فلوحظ تكوينها لهذا الغاز على شكل راسب اسود في قعر الأنبوبة وذلك نتيجة وجود ثايوسلفات الصوديوم و سترات الأمونيوم والحديد (Bradshaw, 1992; Macfaddin, 2000).

10. اختبار إزالة مجموعة الكاربوكسيل Decarboxylase Test

لقح وسط Falkow decarboxylase السائل الحاوي على الحامض الأميني اللايسين أوالارجنين بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة. ان تحول لون الوسط من اللون البنفسجي الى اللون الأصفر دليل على سالبية الاختبار نتيجة تخمر السكر الموجود في الوسط في حين دل بقاء لون الوسط البنفسجي على ايجابية الاختبار نتيجة إزالة مجموعة الكاربوكسيل من الحامض الأميني اللايسين أو الارجنين (BBL, 1973; Macfaddin , 2000).

11. اختبار تخمر السكريات Sugers Fermentation Test

جرى هذا الاختبار كما جاء في Macfaddin (2000) اذ لقح وسط تخمر السكريات بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة 37 °م لمدة 24-48 ساعة. أشار تغير لون الوسط من اللون الأحمر الى اللون الأصفر الى ايجابية الاختبار وان الغاز الناتج وثق وجوده بتكون فقاعات غازية في الوسط الزرعي.

12. اختبار الأكسدة والتخمر Oxidation and Fermentation Test

لقح زوج من الأنابيب الحاوية على وسط التخمر والأكسدة بالمزروع البكتيري وأضيف بعد ذلك لأحد الأنبوبين شمع البرافين (المعقم بالفرن لمدة ساعة) بارتفاع 2 سم لتوفير ظروف لاهوائية وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24-48 ساعة. ان تحول لون الوسط في الأنبوبة غير المغطاة من اللون الأخضر الى اللون الأصفر دليل على أكسدة السكر الموجودة أما تغير لون الوسط في الأنبوبة المغطاة من اللون الأخضر الى اللون الأصفر فأشار الى تخمر السكر الموجود (Macfaddin, 2000).

13. اختبار استهلاك المالونيت Malonate Utilization Test

لقح وسط المالونيت السائل بالمزروع البكتيري وحضن عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24-48 ساعة. إنّ تغير لون الوسط من اللون الأخضر الى اللون الأزرق دليل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

4.2.2.2 إدامة المزارع البكتيرية Maintenance of Bacterial Culture

حفظت عزلات بكتريا الحليب النقية وذلك بنقل النمو البكتيري النامي بعمر 18 ساعة الى وسط الإدامة ذي التركيز 15% غليسيرول (85 مليلتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل و15 مليلتر من الغليسيرول) وبعد الحضن عند درجة37 °م لمدة 18 ساعة لوحظ النمو بتكون عكورة في الوسط ثم حفظت عند درجة حرارة –20 °م في المجمدة (Feltham *et al.*, 1978).

كما تم حضن العزلات البكتيرية النقية على وسط نقيع القلب والدماغ الصلب أو وسط الغراء المغذي الصلب لإجراء التجارب والاختبارات المذكورة انفاً عليها إذ خططت موائل (Slants) ذلك الوسط بالعزلات وبعد مدة حضانة أمدها18-24 ساعة عند درجة حرارة 35 °م حضنت هذه الموائل عند درجة حرارة 4 °م في الثلاجة وتم تجديدها كل شهرين.

5.2.2.2 التحليل الإحصائي Statistical Analysis

طبقاً لطبيعة النتائج التي حصل عليها أجريت التحليلات الإحصائية باستعمال اختبار t واختبار تحليل التباين(ANOVA) واجاد معامل الارتباط (r) لتحليل البيانات إحصائياً وتحديد الفروقات المعنوية على مستوى احتمالية 0.05 و 0.01 اعتماداً على ماذكر في الراوي (1992).

الفصل الثالث
Chapter Three
3. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.3 العزل والتشخيص

أجريت الاختبارات الكيموحيوية المدونة في جداول -1 و-2 و-3 على العزلات البكتيرية المستحصل عليها في هذه الدراسة والبالغة 366 عزلة بكتيرية مقسمة على 172 عزلة معزولة من عينات الحليب البقري الخام الخمسين و44 عزلة معزولة من عينات المسحات الجدارية لحاويات الحليب و150 عزلة معزولة من الشرائح الزجاجية المغمورة في حاويات الحليب بالاعتماد على جداول وطرائق تشخيص قياسية (BBL, 1973; Holt *et al.*, 1994; Stukus, 1997; Macfaddin, 2000).

2.3 تحديد العزلات البكتيرية الملوثة للحليب البقري الخام

تضمنت عملية تحديد المحتوى البكتيري للحليب فحص 50 عينة حليب إذ وجد من نتائج هذه الدراسة تعدد العزلات البكتيرية الملوثة للحليب. تم عزل 172 عزلة بكتيرية ولوحظ أنّ العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام متواجدة بنسبة (57%) اكبر من العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام(43%) وكما هو موضح في شكل -4 وهذا يتفق مع ما ذكره عدد من الباحثين (Mehlman and Romero, 1982; Abdulla and Musleh, 1988; Mckinnon *et al.*,1988) إذ أشاروا الى أنّ نسبة العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام أعلى من العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام. أكد Garbutt (1997) على أنّ نسبة تواجد العزلات البكتيرية المختلفة في الحليب ومستوى التلوث يعتمد على نوع الحيوانّ وغذائه وحالته الصحية وظروف الحلب ورجح أنّ تكون البكتريا السالبة لصبغة كرام هي الأكثر تواجداً في حين لم تتطابق هذه النتيجة مع ما توصلت إليه بعض الدراسات التي أشارت الى أنّ هذه النسبة تختلف عند الإصابة بالتهاب الضرع إذ وجد أنّ نسبة البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي الأكثر تواجداً في حالة التهاب الضرع الناتج عن الإصابة بهذه البكتريا (Abdulla *et al.*, 2002) في حين وجد أنّ نسبة البكتريا المعوية هي الأكثر عندما تكون هي المسبب لالتهاب الضرع (Hirvonen *et al.*, 1999).

بعد تشخيص العزلات البكتيرية الملوثة للحليب قسمت كما يأتي:

1.2.3 العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام

تم عزل وتشخيص 98 عزلة بكتيرية سالبة لصبغة كرام ولوحظ من خلال النتائج أنّ بكتريا *E.coli* هي الملوث الرئيس لعينات الحليب ضمن مجموعة العزلات السالبة لصبغة كرام وكما هو مبين في شكل -5 إذ عزلت بنسبة 15.1% من المجموع الكلي للعزلات وهذا ما أكده Mckinnon وجماعته (1988) إذ أشاروا الى أنّ هذه البكتريا هي السائدة في عينات الحليب من خلال دراسة أجريت على ثلاث مزارع للأبقار ووجد أنّ أعدادها تزداد في الحليب عند الإصابة بالتهاب الضرع المتسبب عنها (Takemura *et al.*, 2003) تلاها جنس *Enterobacter* (*E. aerogenes*,5.2%, *E. gergoviae*,2.9%, *E. amnigenus*,2.3%, *E. hermaechei*,0.6%, *E. sakazakii*,0.6%) الذي عزل بنسبة 11.6% وجاء جنس *Klebsiella* (*K. pneumoniae*,5.8%, *K. oxytoca*,1.7%, *K. terrigena* 1.2%) في المرتبة الثالثة بنسبة 8.7% بعدها جاء جنس *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*,3.5% *P.* alcaligenes ,3.5%) بنسبة 7%.

اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Kuwajock وجماعته (1999) إذ عزلوا البكتريا العائدة لاجناس *Pseudomonas* بنسبة 7.7% *Klebsiella* بنسبة 6.3% في حين لم تتوافق نسبة عزل بكتريا*E. coli* في الدراسة المذكورة أنفاً مع نتيجة الدراسة الحالية إذ بلغت نسبة العزل 4.3%.

اقتربت نتائج الدراسة التي قام بها Abdulla وجماعته (2002) من النتائج الحالية فيما يخص عزل بكتريا *E.coli* التي عزلت بنسبة 22.5% في حين عزلت بكتريا *Klebsiella* بنسبة 4.4%. عزل Al-Graibawi وجماعته (1985) بكتريا*E. coli* بنسبة 4.69% و *P. aeruginosa* بنسبة 1.56%. أشار Mehlman وRomero (1982) الى أنّ البكتريا المعوية المتمثلة ببكتريا *E.coli* و*Klebsiella* و*Enterobacter* هي من مسببات تفشي الكثير من الأمراض في الولايات المتحدة منها التهاب الأمعاء نتيجة تواجدها في أغذية كثيرة منها الحليب ويشير وجود البكتريا المعوية في الحليب الى حصول تلوث برازي.

تم ايضاً عزل جنس *Aeromonas* (*A. caviae*,3.5% *A. salmonicida* 1.7%) بنسبة 5.2% واتفق هذا مع ما توصل إليه الباحث El-Gamal (1997) في دراسة أجريت في مصر إذ تمكن من عزل هذه البكتريا من الحليب البقري الخام وبين أنّ وجودها في الحليب يشير الى حدوث تلوث برازي في حين عزلت بكتريا *S.choleraesuis* بنسبة 2.3% ويعد وجود هذه البكتريا في الحليب غير مقبول كونها سبب في بعض الأمراض إذ أشار Zottola (2001) الى خطورة تواجدها وبكتريا *E.coli* في الحليب وأكد ضلوعهما في إحداث تفشيات خطيرة وهذا ما أكده أيضاً Thomas وجماعته (1966).

عزلت كل من بكتريا *Y. enterocolitica* ،*B. melitensis* ،*A. faecalis* و*N.flavescens* بنسبة 1.7% لكل واحدة منها واتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه El-Said وجماعته (1997) إذ عزلوا بكتريا *Y.enterocolitica* بنسب كبيرة من حليب أبقار سليمة وأشار الى أنّ وجودها في الحليب الخام غير مقبول وذلك بسبب وجود بعض العزلات الضارية لهذه البكتريا.

بين Prescott وجماعته (1990) أنّ بكتريا *B.melitensis* التي تسبب مرض Brucellosis تنتقل عن طريق الحليب أيضاً.

هنالك العديد من البكتريا غير الممرضة موجودة طبيعياً في الحليب بمستويات عالية أو واطئة لا تسبب أمراض ولكنها تسبب تغيرات في الحليب مثل *Pseudomonas* و*Alcaligenes* (Bradshaw, 1992).

لم تتطرق الأبحاث المستحصل عليها الى عزل بكتريا *Neisseria* من الحليب ويرجح أنْ يكون مصدر وجودها في الحليب هو أدوات التعامل مع الحليب غير المنظفة بشكل جيد او المياه المستعملة في التنظيف وقد تكون من الاتربة المنتقلة من ارضية الحقل.

2.2.3 العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام

تم عزل 74 عزلة بكتيرية موجبة لصبغة كرام كما هو موضح في شكل -6 اذ سجلت أعلى نسبة في هذه المجموعة لجنس *Staphylococcus* (1.7% *S.xylose* 2.3% *S.epidermidis*,9.9% *S.aureus*) مقدارها 13.9% من المجموع الكلي للعزلات وتعد هذه البكتريا واسعة الانتشار في الحليب (Bennet *et al.*, 1986) إذ تتواجد بنسب مختلفة وتزداد في حالة التهاب الضرع المتأتي من الإصابة بها إذ وجدت بنسبة 39.9% في دراسة قام بها Garcia وجماعته (1980). لم تتطابق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Al-Graibawi وجماعته (1985) في دراسة أجراها على حليب الأغنام كانت نسب *S. aureus* و *S. epidermidis* 50% و25% على التوالي في حين بين Matos وجماعته (1991) أنّ وجود بكتريا *S.xylose* يشير الى حدوث تلوث للحليب مصدره غذاء الحيوان. أشارت الكثير من الأبحاث

الى إمكانية إنتاج بكتريا *Staphylococcus* سموم معوية خطيرة تسبب التسمم الغذائي (Otero *et al.*, 1988).

أماجنس *Streptococcus* (*S. agalactiae*,7.6% *S. bovis*,3.5% *S.* Salivarius 1.7%) فعزلت بنسبة 12.8% وتوافقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Abdulla وجماعته (2002) إذ عزلت بنسبة 12.5% في حين اختلفت كثيراً عن النسبة التي حصل عليها Mckinnon وجماعته (1988) إذ أشاروا الى أنّ بكتريا *S. agalactiae* تواجدت بنسبة 25% وقد نسب هذا الى حدوث التهاب الضرع نتيجة الإصابة بهذه البكتريا وتمكن Flint وجماعته (1997a) من عزل بكتريا *S. bovis* من عينات الحليب، في حين يشير وجود بكتريا *S. salivarius* الى حدوث تلوث ناتج عن العطاس أو السعال وذلك لكون هذه البكتريا متواجدة طبيعياً في اللعاب. وجد أنّ بكتريا *S. aureus* و*S. agalactiae* تزداد أعدادها في الحليب عند الإصابة بالتهاب الضرع المتسبب عنها (Boddie and Nickerson, 2002).

عزل جنس *Micrococcus* (*M.lylae*,2.3%, *M.luteus* 4.1%) بنسبة 6.4% وفي هذا الصدد أشار Garbutt (1997) وICMSF (1998) الى أنّ هذه البكتريا متواجدة طبيعياً في الحليب وأنّ أول مصدر يزود الحليب بها هو الضرع.

في حين كانت نسبة عزل جنس *Bacillus* (*B. cereus*,4.1% *B. firmus* ,1.2%) هي 5.3% وتوافقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Kuwajock وجماعته (1999) إذ عزلوا بكتريا *Bacillus* بنسبة 5.3% ويعد وجودها سبباً لحدوث أمراض التسمم المعوي وتؤثر أيضاً في نوعية الحليب (Aggarwal and Srinivasan, 1986). لم تتطابق هذه النتيجة مع ما توصل إليه كل من Ahmed وجماعته (1983) اللذين عزلوا بكتريا *B.cereus* بنسبة 9% ومهدي (2001) الذي عزلها بنسبة 38% من الحليب المعامل بالحرارة وتتواجد هذه البكتريا في الحليب ومنتجاته بكثرة إذ تسبب أمراض معوية وحالات تسمم (Werner and Hotchkiss, 2002) وسجل جنس *Listeria* (*L. welshimeri* ,1.7% *L. gragi*,2.9%) اقل نسبة مقدارها 4.6% وتوافقت هذه النتيجة مع ما ذكره Bradshaw وجماعته (1987) عن إمكانية عزل هذه البكتريا من الحليب الخام.

3.3 التعداد البكتيري الكلي الحي

إنّ التعداد البكتيري الكلي الحي من طرائق الزرع الرئيسة والشائعة في فحص الحليب وهي طريقة معتمدة لتحديد العدد البكتيري الكلي الحي (Harris and Sommers, 1968; Stukus, 1997) وتعد من العناصر المهمة في تحديد جودة الحليب (Schaik *et al.*,2002). يحتوي جدول -4 على الأعداد البكتيرية اللوغاريتمية التي تم الحصول عليها بهذه الطريقة . تراوح العدد البكتيري الكلي بين 6.43-8.16 خلية/مليلتر واقتربت هذه النتيجة الى حد ما مع ما توصل إليه Santos وجماعته (1981) إذ وجدوا أنّ TPC تراوح بين 4-7.17 خلية/مليلتر في حين ابتعدت عما توصل أليه كل من Aggarwal و Srinivasan (1986) اللذين وجدا أنّ TPC تراوح بين 4-5.5 خلية/مليلتر وتطابقت مع ما توصل إليه Ellis وMeldrum (2002) إذ وجدا أنّ TPC تراوح بين 6.3-8 خلية/مليلتر.

يعزى التعداد البكتيري الكلي العالي المستحصل عليه في هذه الدراسة الى عدم تطبيق الشروط الصحية وعدم نظافة الأدوات المستعملة وقد يعود السبب الى المدة الزمنية المستغرقة في نقل الحليب من مكانّ الإنتاج الى مكان الجمع والتصنيع (ICMSF, 1998). ابتعدت هذه النتيجة كثيراً عما توصل إليه Kuczaj (2001) إذ وجد أنّ TPC محصوراً بين 4-4.5 خلية/مليلتر وبين أنّ هذه النتيجة تعود الى تطبيق الشروط الصحية والعناية البيطرية الكاملة في مزارع الابقار.

تراوح تعداد بكتريا القولون بين0-6 خلية/مليلتر، ابتعدت هذه النتيجة الى حدٍ ما عما توصل إليه كل من Hill وShears (1979) إذ وجدا أنّ التعداد اللوغاريتمي لهذه البكتريا تراوح بين 6-7 خلية/مليلتر وDesai و Nataragan (1981) اللذان توصلا الى أنّ عددها اللوغاريتمي تراوح بين 4.5-7.4 خلية/مليلتر. تعود الزيادة في أعداد بكتريا القولون الى حدوث التهاب ضرع ناتج عن الإصابة بهذه البكتريا أو حدوث تلوث برازي (Hirvonen *et al.*, 1999). أما التعداد اللوغاريتمي لبكتريا *Staphylococcus* فكانّ بين 0-5.62 خلية/مليلتر. اقتربت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Santos وجماعته (1981) إذ وجدوا أنّ الأعداد اللوغاريتمية لهذه البكتريا كانت بين 3-5.57 خلية/مليلتر من دراسة أجريت في البرازيل وأشاروا الى أنّ الحليب يساهم في تفشي التسمم الغذائي الناتج من هذه البكتريا. قد يكون السبب وراء تواجد هذه الأعداد العالية من البكتريا الى امتزاج الحليب السليم مع حليب ضرع ملتهب.

بصورة عامة خرجت النتائج المستحصل عليها في هذه الدراسة عن القياسات المحدد لها من قبل منظمة الصحة العالمية WHO (1984) وMarth (1978) وKuczaj (2001) فقد سمحت هذه الجهات بأنّ لايتجاوز التعداد البكتيري الكلي عن 10^5 خلية/مليلتر وتعداد CPC عن 10 خلية/مليلتر وقد يكون سبب هذه النتيجة عدم تطبيق الشروط الصحية أثناء إنتاج الحليب والنقل غير المبرد وطول المدة التي ينقل فيها.

جدول -4: التعداد البكتيري الكلي (TPC) وتعداد بكتريا القولون(CPC) وبكتريا *Staphylococcus* (SPC) في الأشهر الحارة والباردة

رقم العينة	الأشهر الحارة لوغاريتم الاعداد البكتيرية(خلية/مليلتر)			الأشهر الباردة لوغاريتم الاعداد البكتيرية(خلية/مليلتر)		
	TPC	CPC	SPC	TPC	CPC	SPC
1	8.1	5.69	5.3	7.99	5.3	0

2	8.13	5.95	5.18	7.16	5.63	5.5
3	7.95	5.56	0	6.67	5.58	0
4	8.1	6	0	7.14	5.2	5.48
5	8.11	5.83	0	6.99	5.4	0
6	7.9	5.34	0	7.68	0	0
7	8.02	5.28	5.3	7.76	5.81	0
8	8.16	5.63	5.08	7.57	5.4	0
9	7.94	5.23	5	7.81	5.74	0
10	8.14	5.43	0	7.62	5.79	0
11	8.06	5.14	0	7.49	5.88	5
12	7.9	5.36	0	7.79	5.43	5.53
13	8.04	5.04	0	7.14	5.99	0
14	7.96	5.11	0	7.8	4.6	4
15	8.13	5.79	5.18	7.76	5.64	0
16	8.12	5.54	0	7.99	5.18	5.38
17	8.08	5.83	0	8.05	4.9	0
18	8.1	5.6	5.11	7.97	6	0
19	7.9	4.95	0	6.97	5.26	4.48
20	7.09	5.46	0	7.13	5.52	4.3
21	7.67	5.4	0	6.52	5.89	0
22	7.04	5.6	0	6.43	4.7	0
23	7.55	4.3	0	6.83	5.8	4
24	7.16	5.73	0	6.59	0	0
25	7.15	5.04	5.62	7.9	5.86	0

1.3.3 تأثير التغاير الفصلي في التعداد البكتيري الكلي

بينت نتائج الدراسة الحالية بأنّ هنالك فروقات معنوية بنسبة 1% بين TPC المحسوب خلال الأشهر الحارة (أيار، حزيران، تموز) وTPC المحسوب خلال الأشهر الباردة (كانون الأول، كانون الثاني، شباط) وكما هو موضح في جدول -5 إذ وجد أنّ معدل TPC (7.86±0.07 خلية/مليلتر) المحسوب في الأشهر الحارة أعلى من نظيره المحسوب خلال الأشهر الباردة (7.39±0.1 خلية/مليلتر). هذا يعني انه عند زيادة درجة الحرارة تتوافر ظروف افضل لنمو البكتريا من تلك المتوافرة في درجات الحرارة الواطئة.

تطابقت هذه النتيجة مع النتائج التي توصل إليها بعض الباحثين فقد لاحظ Nakae وجماعته (1978) وSchaik وجماعته (2002) أنّ لفصول السنة تأثيراً في TPC وتحديداً وجدوا أنه يزداد في فصل الصيف وهذا ما أكده Abou-Donia و El-Soda (1986). أشار Bradshaw (1992) الى أنّ درجة حرارة الصيف العالية تساهم في نمو أعداد كبيرة من البكتريا في الحليب في حين لم تتوافق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Kuczaj (2001) الذي قلل من أهمية الفروقات التي تخلفها فصول السنة على TPC. قد تعود الاختلافات بين النتائج المستحصل عليها في هذه الدراسة وتلك الموجودة في دراسات أخرى الى الاختلافات ضمن فصول السنة وبين بلد وآخر فضلاً عن اختلاف طرائق جمع عينات الحليب واختلاف حساسية الطرائق المتبعة في فحصه.

أما بالنسبة لتعداد CPC فلا توجد فروقات معنوية بين المعدل المحسوب في الأشهر الحارة (5.43±0.08 خلية/مليلتر) و بين ذلك المحسوب في الأشهر الباردة (5.06±0.3 خلية/مليلتر) وهذا يدل على الإهمال في تطبيق الشروط الصحية المتبعة في إنتاج الحليب وحدوث تلوث برازي (Marth, 1978). توافقت هذه النتيجة مع ما ذكره Abdulla وجماعته (2002) إذ أشاروا الى أنّ البكتريا المعوية متواجدة وبشكل كبير في كل الفصول. بين عبود وجماعته(1991) أنّ الحليب يعد من اكثر الأغذية المساهمة في نشر الأمراض لأنه بيئة صالحة لنمو البكتريا الممرضة وحددت مجاميع بكتيرية تعيش في أمعاء الإنسان والحيوان كمؤشرات تلوث ومن أهمها بكتريا القولون.

لم تسجل فروقات معنوية بين معدل SPC في الأشهر الحارة (1.67±0.5 خلية/مليلتر) وبين معدلها في الأشهر الباردة (1.75±0.48 خلية/مليلتر) وهذا يؤكد على أنّ فصول السنة لاتؤثر في وجود هذه البكتريا في الحليب وأنّ مصدر التلوث بها يكون أما عن طريق الأسطح الخارجية للضرع أوعن طريق الأدوات غير النظيفة وقد يعود الى إفرازها مع الحليب كما في حالة إلتهاب الضرع الناتج عن الإصابة بها (Eden, 1977; Wilson and Richards, 1980).

جدول -5 : تأثير التغاير الفصلي في التعداد البكتيري الكلي (TPC) وتعداد بكتريا القولون (CPC) و بكتريا *Staphylococcus* (SPC)

التعداد	الأشهر الحارة			الأشهر الباردة			نتائج اختبار t
	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المعدل ± خ.ق	الحد الأدنى	الحد الأعلى	المعدل ± خ.ق	
TPC	7.04	8.16	7.86±0.07	6.43	8.05	7.39±0.1	**
CPC	4.3	6	5.43±0.08	0	6	5.06±0.3	
SPC	0	5.62	1.67±0.5	0	5.53	1.75±0.48	
عدد العينات	25			25			

خ . ق: خطأ قياسي

** يوجد فرق معنوي بين معدلات TPC المحسوبة في الأشهر الحارة والباردة عند مستوى معنوية 1%

2.3.3 تأثير التعداد البكتيري الكلي في قيم الرقم الهيدروجيني

أظهرت نتائج قياس قيم pH لعينات الحليب الخمسين وجود علاقة ارتباط عكسية بين هذه القيم وبين العدد البكتيري الكلي ولكلا الفصلين كما هو مبين في شكل -7 و-8. إذ سجلت أعلى قيمة لـ pH (6.8) في الأشهر الحارة والباردة في حين كانت اقل قيمة له (5.8) في الأشهر الحارة وبمعدل 6.3 في الأشهر الحارة و6.6 في الأشهر الباردة.

عند حساب معامل الارتباط بين TPC وقراءات pH للأشهر الحارة وجد أنه يساوي 0.8 - وهذا يشير الى وجود علاقة ارتباط عكسية قوية بينهما ويعود هذا الى المستوى العالي لـ TPC في هذه الأشهر إذ إنّ وجود البكتريا يؤدي الى تخمير سكر اللاكتوز الى حامض وغاز مما يؤدي الى خفض قيمة pH في حين ارتفاع قيمته يعود الى تحلل بروتين الحليب مائياً الى أحماض أمينية حرة وإنتاج الامونيا (Bradshaw, 1992).

أما الأشهر الباردة فسجل فيه معامل الارتباط قدره 0.4 - بين TPC وقراءات pH وتشير هذه القيمة الى وجود علاقة ارتباط عكسية ضعيفة وقد يعود هذا الى قلة أعداد TPC المسجلة في هذه المدة نوعاً ما ومن ثم عدم إنتاج حامض كافي لخفض قيمة pH كثيراً.

تطابق هذا مع ما توصل إليه كل من Aggarwal و Srinivasan (1986) إذ وجدا أنّ قيمة pH تنخفض بزيادة TPC. ذكر Majewski (1987) أنّ pH قد يتعرض لارتفاعات طفيفة أثناء الإصابة بالتهاب الضرع.

4.3 دراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا وتكون الغشاء الحيوي

تم جمع 20 عينة حليب استعملت لإجراء دراسة مزدوجة شملت دراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا في الحليب ولأستبيانّ العلاقة بين TPC الابتدائي وTPC المحسوب بعد 24 و48 ساعة وللتعرف على تأثير زيادة الأعداد البكتيرية في قيم pH .

خصص الشطر الثاني من هذه الدراسة للتعرف على أنواع وأعداد البكتريا الملتصقة على جدرانّ حاويات الحليب وللتحري عن كون هذه البكتريا كونت أم لم تكون أغشية حيوية في حاويات الحليب فكانت نتائج هذه الدراسة كما يأتي:

1.4.3 علاقة التعداد الابتدائي للبكتريا مع أعدادها خلال مدة الخزن وتأثيرها في قيم pH

لتحديد العلاقة بين معدل TPC الابتدائي المحسوب في المدة صفر ومعدله المحسوب بعد مرور 24 و48 ساعة من الخزن عند درجة حرارة 30 $\pm$ 1 °م جرى حساب معامل الارتباط بينهما ولوحظ وجود علاقة ارتباط عالية جداً بين معدل TPC المحسوب في المدة صفر وTPC المحسوب بعد مرور 24 ساعة إذ سجل معامل ارتباط قدره 0.92 وازدادت علاقة الارتباط بين معدل TPC المحسوب في المدة صفر وبين ذلك المحسوب بعد مرور 48 ساعة إذ بلغت قيمة معامل الارتباط 0.96.

سجلت أيضاً علاقة ارتباط طردية بين معدل TPC المحسوب بعد 24 ساعة وبين نظيره المحسوب بعد 48 ساعة إذ بلغت قيمة معامل الارتباط 0.9 وكما هو مبين في شكل-9. أشار عبود وجماعته (1991) الى أنه خلال مدة عدة ساعات من خزن الحليب عند درجة حرارة متوسطة تصبح الأعداد البكتيرية كبيرة إذ تتكون أحماض وغازات ويحدث تغير في لون الحليب وزيادة في لزوجته وظهور رائحة غير مقبولة ويساهم pH الحليب المعتدل في نمو وتكاثر البكتريا الموجودة فيه (Calsamiglia *et al.*, 2002).

ولاستبيان العلاقة بين معدل TPC وقراءات pH في مدة الصفر وجد أنّ معامل الارتباط يساوي 0.73 – وهذا يشير الى وجود علاقة ارتباط عكسية بين معدل TPC وبين قيم pH ولوحظ أنّ هذه العلاقة قد ازدادت مع زيادة مدة الخزن إذ سجل معامل ارتباط قدره 0.78 – و0.8 – بين معدل TPC وقراءات pH بعد مرور 24 و48 ساعة على التوالي وهذا موضح في شكل -10 و يدل هذا على انه كلما زادت أعداد البكتريا انخفضت في المقابل قيم pH ولأسباب ذكرت سابقاً (2.3.3). تطابقت هذه النتيجة مع ما ذكره Otero وجماعته (1988) إذ لاحظوا أنه بزيادة أعداد البكتريا يبدأ pH بالانخفاض وذكر Goel وجماعته (1970) أنّ قيم pH تنخفض مع زيادة مدة الخزن.

2.4.3 أنواع وأعداد البكتريا المكونة للغشاء الحيوي في حاويات الحليب

تم عزل 44 عزلة بكتيرية من 20 عينة حليب أثناء عملية مسح جرت لموقعين حدد كل منهما بمساحة 1سم^2 داخل كل حاوية واخذ لكل موقع ثلاث مسحات منفردة الواحدة بعد الاخرى.

استعملت طريقة المسحة لدراسة تكون الغشاء الحيوي إذ أوصى بها العديد من الباحثين فقد أشار Chmielewski و Frank (2003) الى أنّ هذه الطريقة تعطي نتيجة قيمة عن أعداد البكتريا الحية المكونة للغشاء الحيوي قياساً بطرائق المسح الإلكتروني إذ يحتوي الغشاء الحيوي على بكتريا حية وميتة وتقدر البكتريا الحية بـ 80% في الغشاء الفتي و50% في الغشاء القديم وبين أنّ هذه الطريقة سهلة وغير مكلفة.

دلت النتائج على أنّ البكتريا السالبة لصبغة كرام هي السائدة في تكوين هذه الاغشية وبنسبة 81.82% (شكل -11) وشكلت بكتريا *E. coli* أعلى نسبة بلغت 20.5% بعدها جاء جنس *Enterobacter* (*E. aerogenes*,6.8% *E. gergoviae*,4.5% *E.* agglomerans,2.3%) بنسبة 13.6% في حين حصل كل من جنس *Klebsiella* (*K. pneumoniae*,9.1%,*K.*terrigena ,2.3%) و *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*,9.1% *P.* alcaligenes ,2.3%) على نسبة متماثلة بلغت 11.4% لكل منهما تلاهما بكتريا *S. choleraesuis* و جنس *Neisseria* (*N. canis*,2.3% *N. flavescens* ,4.5%) التي عزلت كل منهما بنسبة 6.8% وعزلت بكتريا *C. amalonaticus* و *P. vulgaris* بنسبة 4.5% لكل منهما في حين تم الحصول على عزلة واحدة من بكتريا *S. sonnei* وبنسبة 2.3%.

أما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فعزلت بنسبة 18.18% وعزلت بكتريا *S.aureus* بنسبة 9.08% و *S.epidermidis* بنسبة 2.3% و*B.cereus* بنسبة 6.8% (شكل-12 و-13).

تطابق هذا مع ما ذكره O'Toole وجماعته (2000a) عن كون بكتريا *E.coli* شائعة في تكوين الغشاء الحيوي وكذلك بكتريا *P. aeruginosa* وأشاروا الى أنّ البكتريا السالبة لصبغة كرام هي الشائعة في تكوين الغشاء الحيوي وقللوا من أهمية تكونه بوساطة البكتريا الموجبة لصبغة كرام مع هذا وجد أنّ *S. aureus* و*S. epidermidis* لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي (Atmaca *et al.*, 2000).

أكد Sutherland (2001) على أنّ الغشاء الحيوي متعدد الأنواع على الأغلب وبين إمكانية تكوينه من قبل *E. aerogenes, E. agglomerans* و *K. pneumoniae*. بين Flint وجماعته (1997c) أنّ الطريقة المثلى لدراسة هذه الأغشية هي المسحة إذ استعملها لإزالة البكتريا الملتصقة والمكونة للغشاء الحيوي في معامل الالبان وأكد على أنّ البكتريا السالبة لصبغة كرام تحظى بفرصة اكبر للالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي من نظيرتها الموجبة لصبغة كرام ووجد أنّ البكتريا المكونة لهذه الأغشية تزود الحليب المار فوق مواقع التصاقها بما يزيد على 10 ^{6} خلية/مليلتر ووجد أنّ أحد أنواع البكتريا الملتصقة هي بكتريا *B. cereus*. اتفقت النتائج المستحصل عليها التي ضمت عزل بعض أنواع البكتريا الممرضة من المسحات مع ما ذكره Zottola (2001) الذي أشار الى إمكانية تكوين البكتريا الممرضة الغشاء الحيوي في الحليب مثل جنس *Salmonella*.

بينت النتائج الحالية أنّ البكتريا المتحركة لها القدرة على الالتصاق وتكوين الغشاء الحيوي اكثر من البكتريا غير المتحركة إذ عزلت البكتريا المتحركة بنسبة 68.18% والبكتريا غير المتحركة بنسبة 31.82%(شكل -11). جاءت هذه النتيجة مطابقة لما وجده Donlan (2002) إذ ذكر أنّ البكتريا غير المتحركة قليلاً ما تكون الغشاء الحيوي وذلك لكون التصاقها أقل من إلتصاق البكتريا المتحركة وهنا يؤكد الباحث على أهمية وسائل الحركة في بدأ عملية الإلتصاق الممهدة لتكوين الغشاء الحيوي. أشار Murphy و Kirkham (2002) الى دور الأسواط والأهداب في تكوين هذا الغشاء وبينا أنّ أساس تكونه هو قدرة البكتريا على الالتصاق.

وجد أنّ TPC المستحصل عليه من عملية المسح يساوي 6×10^{4} خلية/مليلتر لكل سم^{2} من جدار الحاوية وكانت نتائج العد القياسي بالأطباق للمسحات الثلاثة لكلا الموقعين متقاربة في 55% من العينات إذ شهدت هذه العينات زيادة في أعداد البكتريا بشكل متدرج من نتائج زرع المسحة الأولى الى المسحة الثالثة لكل موقع وفي كلا الموقعين في حين أظهرت 20% من العينات تناقص في أعداد البكتريا من المسحة الأولى الى المسحة الثالثة لكل موقع وفي كلا الموقعين في حين لوحظ أنّ هناك زيادة في أعداد البكتريا في موقع ونقصانها في الموقع الأخر وبنسبة 25% من العينات كما هو مبين في جدول-6. يشير الحصول على زيادة في أعداد البكتريا بشكل متدرج من المسحة الأولى الى المسحة الثالثة للموقع الواحد الى تكون الغشاء الحيوي في ذلك الموقع والانخفاض الطفيف يعد مقبولاً الى حدٍ ما وأكد ذلك كل من Jessen و Lammert (2001) اللذين وجدا أنّ معدل TPC في المسحات الثلاث كانّ 3.7×10^{4} خلية / سم^{2} في تجربة قاما بها على السطوح الصلبة الملامسة للأغذية واستنتجا أنّ الأعداد المتقاربة المتزايدة في المسحات الثلاث تشير الى تكون الغشاء الحيوي مع قبولهما بالانخفاض الطفيف في

TPC في بعض المواقع. تقاربت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Kolari وجماعته (2001) إذ وجدوا أنّ TPC لبكتريا *Bacillus* الملتصقة على السطوح المعدنية الصناعية تراوح بين 400-2 × 10^5 خلية / سم^2 في تجربة استعملوا فيها بكتريا *Bacillus* لبناء غشاء حيوي خلال مدة 22 ساعة.

قد يعود الانخفاض في TPC في موقع وارتفاعه في موقع آخر الى نسجة السطح الذي قد يكون أملس أذ لاتلتصق عليه البكتريا بسهولة وقد يكون خشن يساهم في تعزيز ارتباط البكتريا ويمنع إزالتها بسهولة وهذا ما أكده Donlan (2002) و Deibel (2000) إذ بينا أنّ السطح الخشن يحمي البكتريا من قوى الضغط و حركة السوائل وكذلك يساعد كبر المساحة السطحية له على نمو أعداد كبيرة من البكتريا. تطابقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Flint وجماعته (1997a) من خلال إجرائهم تجربة ضمت سبع عينات حليب مبستر إذ استعملت قطع معدنية محدد فيها مساحة 1سم^2 لموقعين ووضعت في عينات الحليب ودرست قابلية *S. bovis* المعزولة من الحليب على تكوين الغشاء الحيوي على هذه القطع فوجد أنّ TPC بلغ 4 × 10^5 خلية / سم^2 باستعمال طريقة المسحة.

أنّ تكون الغشاء الحيوي في حاويات الحليب قد تطابق مع ما توصل إليه Yoo وChen (2002) إذ ذكرا أنّ هذه الأغشية تتكون بكثرة في أدوات إنتاج الحليب وتساهم السطوح الخشنة بتكوينه وأشار Flint وجماعته (1997c) الى أنّ بروتينات الحليب هي اكثر البروتينات أهمية في التصاق البكتريا وتكوين الغشاء الحيوي.

لوحظ أيضاً تكون طبقة لزجة على الجدار الداخلي للحاوية بعد الخزن وبالرجوع الى المصادر وجد أنّ هذه الطبقة هي مواد متعددة خارجية تفرزها الخلايا البكتيرية عند تكونها للغشاء الحيوي وهي صفة مميزة له (Sutherland, 2001).

جدول -6: تقدير تكّون الاغشية الحيوية على جدار حاويات الحليب بطريقة المسحة الجدارية

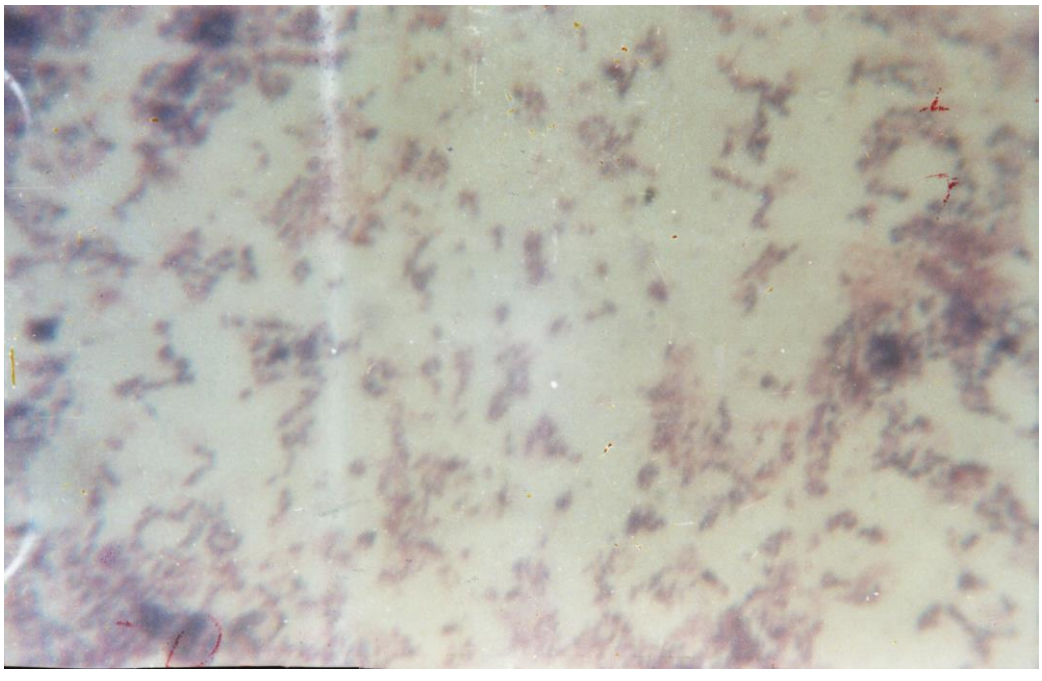
رقم العينة	رقم الموقع	T P C($\times 10^4$) خلية /مليلتر/سم ^{2} رقم المسحة		
		1	2	3
1	1	4.2	5.5	6.3
	2	3.1	2.9	5.2
2	1	1.9	3.3	5.1
	2	2.2	2.6	4.5
3	1	8.7	9.1	11.2
	2	5.3	4.6	6.5
4	1	2.7	2.9	3.2
	2	4.4	5.1	5.9
5	1	0.7	1.8	0.2
	2	2	1.4	0.9
6	1	7.4	5.7	6.7
	2	5	10.3	8.7
7	1	6.5	4.9	7.6
	2	0.9	11.5	12.1
8	1	5.5	3.4	2.9
	2	3	4.6	1.1
9	1	5.7	4.8	9.5
	2	4.2	10.5	11.3
10	1	4.8	6.6	10.5
	2	5.1	7.1	8.4
11	1	10.3	9.8	11.4
	2	9.2	8.6	8.1
12	1	3.7	2.3	1.8
	2	4.2	3.5	3.2
13	1	14	9.6	11.5
	2	10.5	8.7	9.2
14	1	3	4.1	5.9
	2	1.2	2.7	4
15	1	11.5	12.3	13.7
	2	9.1	10.4	12.1
16	1	6.5	8.2	12.5
	2	3.4	6.8	5
17	1	1.1	3.9	5.5
	2	2.9	4.5	1.2
18	1	2.6	1.5	0.8
	2	2.1	3.3	2.5
19	1	7.4	4	6.3
	2	0.5	4.3	7.5
20	1	8.9	9.7	11.5
	2	10.1	11.4	12.3

5.3 الفحص المجهري

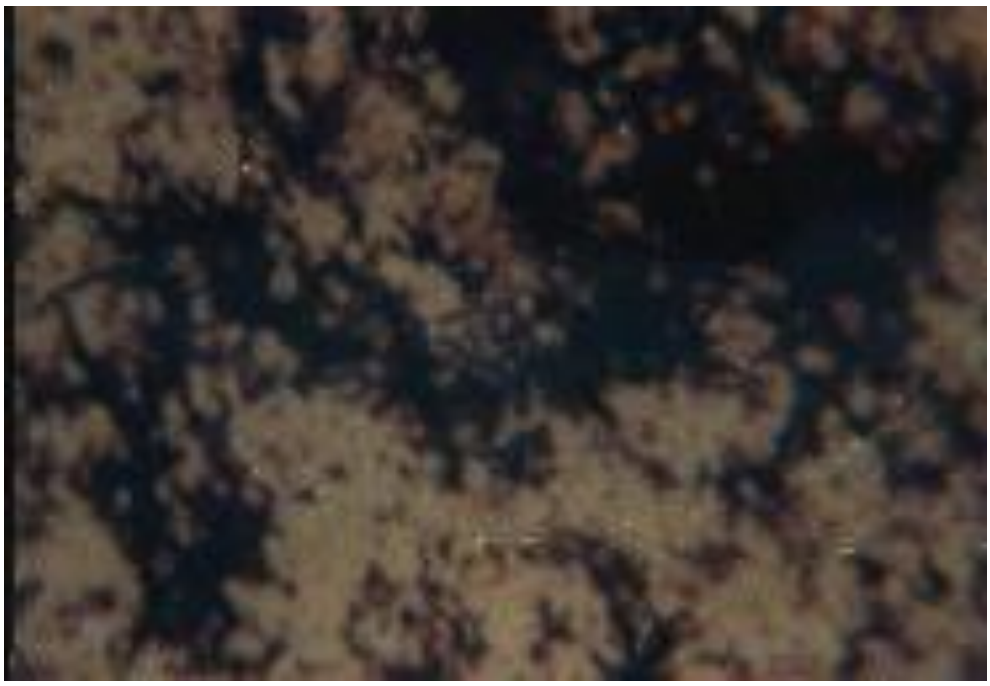
تمت متابعة عملية تكون الغشاء الحيوي من خلال وضع شرائح زجاجية في عينة الحليب ومن خلال نتائج تصبيغ وفحص هذه الشرائح تحت المجهر الضوئي حددت أربع مراحل لتكوين

الغشاء الحيوي إذ تم رفع الشرائح بعد 6، 24، 28 و 48 ساعة من خزن العينة وهذا مشابه لما قام به كل من Marshall (1997) وLawrence وجماعته (1997) إذ درسوا سلوك البكتريا الملتصقة على الشرائح الزجاجية والمكونة للغشاء الحيوي باستعمال المجهر الضوئي والإلكتروني وبطرائق تصبيغ مختلفة.

يبين شكل -14 مراحل تكون الغشاء الحيوي إذ يظهر في شكل A إلتصاق أعداد قليلة من البكتريا وهذا يمثل المرحلة الأولى التي تضمنت أعداد قليلة ومبعثرة من البكتريا الملتصقة وفي شكل B يلاحظ تزايد أعداد البكتريا الملتصقة وقد يعود هذا الى نمو وانقسام الخلايا الملتصقة في المرحلة الأولى أما المرحلة الثالثة فيوضحها شكل C إذ يلاحظ بدء تكون المستعمرات المجهرية التي تكون على شكل بقع أو مجاميع ويبين شكل D المرحلة الرابعة لتكون الغشاء الحيوي ويظهر فيها اندماج المستعمرات المجهرية مع بعضها لتكون غشاء مستمر هو الغشاء الحيوي. شابهت هذه الصور تلك التي حصل عليها Donlan (2002) في بحثه الذي تضمن دراسة حياة الميكروب على السطح أثناء تكوينه للغشاء الحيوي. من حيث كثافة الخلايا تطابقت هذه الصور مع تلك التي حصل عليها Kolari وجماعته (2001) باستعمال المجهر الليزري الماسح إذ وضحت تلك الصور أنّ الخلايا تبدأ بالالتصاق ثم الانقسام والزيادة بالحجم بعدها تكون على شكل تجمعات صغير هي المستعمرات المجهرية التي تتوسع حدودها وتندمج مكونة غشاء حيوي ناضج. في حين أشار Bassler وجماعته (1997) الى أنّ انتحاء الخلايا للالتصاق وتجمعها يخضع لأشارات كيميائية خاصة خارج خلوية بين الخلايا و تساعد هذه الاشارات على انجذاب خلايا حرة الى تلك الملتصقة. تطابقت النتيجة المستحصل عليها في الصور مع ما ذكره Espinosa-Urgel (2003) الذي أشار الى أنّ البكتريا تلتصق أولاً مكونة طبقة أحادية من الخلايا على السطوح ثم تنمو الخلايا الملتصقة وتتجمع لتكون مستعمرات مجهرية التي تنمو لتكون مستعمرات كبيرة مغمورة في EPS وعندها يتكون الغشاء الحيوي.



A: بدء إلتصاق البكتريا بعد 6 ساعات من الحضن عند درجة حرارة 30°م



C: تكون المستعمرات المجهرية بعد 28 ساعة من الحضن عند درجة حرارة 30°م

D: اندماج المستعمرات المجهرية وتكوين الغشاء الحيوي بعد 48 ساعة من الحضن عند درجة حرارة 30°م

6.3 ميكانيكية تكّون الأغشية الحيوية

شملت دراسة ميكانيكية التكّون فحص سبع عينات حليب بحجم 1 لتر لكل عينة، وضعت كل عينة في حاوية سعتها 1 لتر وحضنت عند درجة حرارة 30°م (Flint *et al.*, 1997a). احتوت كل حاوية على ثمانّ شرائح زجاجية موضوعة في حامل زجاجي وتم سحب هذه الشرائح بالتتابع بالاعتماد على المدد الزمنية الاتية 0، 2، 4، 6، 24، 26، 28 و48 ساعة وبمقدار شريحة واحدة في كل مدة.

درست استمرارية التصاق العزلات البكتيرية المختلفة المتواجدة في عينات الحليب لتحديد العزلات البكتيرية الأكثر قدرة على الالتصاق أولاً ثم العزلات التي تلتها في الالتصاق وتم أيضاً دراسة التزايد الحاصل في الأعداد البكتيرية الكلية الملتصقة. يوضح جدول -7 نتائج التصاق العزلات البكتيرية على الشرائح الزجاجية لكل عينة بحسب المدة الزمنية المؤشرة في حين يشير شكل -15 الى النسب المئوية للعزلات البكتيرية الملتصقة في كل عينة. إذ وجد أنّ *E.coli* و *P. aeruginosa* و *Enterobacter* هي اكثر العزلات البكتيرية الملتصقة أولاً إذ تم عزل 150 عزلة بكتيرية من فحص هذه العينات وبعد العزل والتشخيص وجد أنّ هذه العزلات تعود الى 11 نوع بكتيري.

عند عمل إحصائية عامة للنسب المئوية للعزلات البكتيرية الملتصقة في العينات السبع وجد أنّ المرتبة الأولى قد شغلتها بكتريا *E.coli* بنسبة 25.3% بعدها جاءت بكتريا *S.aureus* بنسبة 16.67% وحصلت كل من بكتريا *K. pneumoniae* و *P. aeruginosa* على نسب متماثلة مقدارها 12.67 لكل منهما تلتها بكتريا *E. aerogenes* و *E. gergoviae* بنسب 8.68% و 6.67% على التوالي في حين حصلت كل من بكتريا *B.cereus* و *S.choleraesuis* و *S. epidermidis* على نسبة 4% لكل منها وحصلت بكتريا *P.vulgaris* و *C. amalonaticus* على نسبة 2.67% لكل منهما وهذا موضح في شكل-16. أنّ استعمال الشرائح الزجاجية المغمورة في عينات الحليب يمثل نظاماً ثابتاً لدراسة الغشاء الحيوي إذ أكد Marshall (1997) على أنّ هنالك نظامين لدراسة الغشاء الحيوي الثابت Static system والجاري Flowing system وأشار الى أنه تستعمل في النظام الثابت شرائح زجاجية مغمورة في سائل وترفع هذه الشرائح بعد الخزن لمدة معينة وتزرع ويتم عد البكتريا الملتصقة أو تجفف وتصبغ وتفحص بالمجهر الإلكتروني.

أشار Murphy و Kirkham (2002) الى إمكانية الحصول على غشاء حيوي من خلال تكوينه على شرائح زجاجية باستعمال النظام الثابت. تطابقت نتائج تكون الغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية مع ما توصل إليه Langley و Beveridge (1999) اللذان ذكرا أنّ الغشاء الحيوي يتكون على السطوح الصلبة المغمورة في مادة سائلة.

جدول -7: استمرارية التصاق العزلات البكتيرية على الشرائح الزجاجية المغمورة في حاويات الحليب بحسب مدة الخزن

48	28	26	24	6	4	2	0	المدة الزمنية / العزلات البكتيرية	رقم العينة
+	+	+	_	+	+	+	_	*E. coli*	1
_	+	_	_	+	_	+	_	*E. aerogenes*	
+	+	_	+	+	+	_	_	*S. aureus*	
+	+	+	+	+	_	_	_	*K. pneumoniae*	
+	_	+	+	_	_	-	_	*B. cereus*	
+	_	+	+	_	+	+	_	*P. aeruginosa*	
+	+	_	+	+	_	_	+	*P. aeruginosa*	2
+	+	+	+	+	+	+	_	*E. coli*	
+	+	+	_	_	_	_	_	*K. pneumoniae*	
+	_	+	+	_	+	_	_	*S. aureus*	
+	-	+	+	-	+	+	+	*E. coli*	3
-	+	-	+	-	-	+	-	*S. choleraesuis*	
+	-	+	-	+	+	+	-	*E. aerogenes*	
+	+	-	+	-	+	-	-	*S. aureus*	
+	+	-	-	+	-	-	-	*B. cereus*	
+	-	+	+	-	-	-	+	*P. vulgaris*	4
+	+	+	+	+	+	+	+	*E. coli*	
+	-	+	-	-	+	-	-	*E. gergoviae*	
+	+	+	-	+	-	+	-	*S. aureus*	
+	+	-	+	-	+	-	-	*K. pneumoniae*	
-	-	+	+	+	-	-	+	*C. amalonaticus*	5
+	+	+	-	-	+	-	-	*S. aureus*	
+	+	+	-	+	+	+	-	*E. coli*	
+	-	-	+	-	-	+	-	*S. choleraesuis*	
+	-	+	+	-	+	-	-	*P. aeruginosa*	
+	-	-	+	-	-	-	-	*E. gergoviae*	
+	+	-	+	+	-	+	-	*E. aerogenes*	6
-	+	+	+	-	+	-	-	*S. epidermidis*	
+	-	+	-	+	+	+	-	*E. coli*	
+	-	-	+	+	-	-	-	*S. aureus*	
-	+	-	+	-	+	-	-	*K. pneumoniae*	
+	+	-	+	-	+	+	-	*P. aeruginosa*	7
+	-	+	+	+	-	-	-	*K. pneumoniae*	
+	+	-	+	+	-	+	-	*E. gergoviae*	
+	-	+	-	-	-	-	-	*S. epidermidis*	

تم الحصول على الغشاء الحيوي وذلك بتكوينه على الشرائح الزجاجية خلال مدة 48 ساعة واقتربت هذه النتيجة مع ما توصل لها Deibel (2000) إذ حصل على الغشاء الحيوي خلال 24 ساعة. توافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Chmielewski و Frank (2003) إذ وجدا أنّ جنس *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Salmonella* كثيراً ما تتواجد في الغشاء الحيوي على أدوات التعامل مع الحليب وبينا أنّ أملاح الحليب تساهم في جذب البكتريا للإلتصاق وتحميها بعد الالتصاق وتمكنها من تكوين غشاء حيوي ووجد أنّ هذا الغشاء يتكون بالرغم من تنظيف الأدوات (Lee-Wong, 1994).

تختلف قدرة العزلات البكتيرية على الالتصاق إذ أشارت النتائج المستحصل عليها الى أنّ هناك عزلات من البكتريا مثل *E. coli* تتمكن من الالتصاق أولاً في حين هنالك عزلات أخرى مثل جنس *Bacillus* لم تظهر في الشرائح الأولى وتطابقت هذه النتيجة مع ما وجده Kolari وجماعته (2001) إذ بينوا أنّ وجود بعض الأنواع البكتيرية في الغشاء الحيوي يعتمد على وجود أنواع بكتيرية أخرى مثل جنس*Bacillus* الذي يعتمد في التصاقه على إلتصاق عزلات بكتيرية أخرى أنّ اكثر العزلات البكتيرية الملتصقة أولاً هي بكتريا *E. coli*، *P.aeruginosa* و *Enterobacter* وتنضم إليها بعد التصاقها عزلات بكتيرية أخرى. إنّ انجذاب البكتريا للإلتصاق بالسطح تخضع لميكانيكية جينية لم تشتمل هذه الدراسة على تحديدها إذ بين Bassler (1999) أنّ الانجذاب يتم من خلال إشارات خاصة على شكل جزيئات خارج خلوية تعرف بالمحثات الذاتية التي تطلقها البكتريا الملتصقة وتحفز بها انجذاب بكتريا أخرى.

أظهرت النتائج أنّ البكتريا السالبة لصبغة كرام الملتصقة على الشرائح الزجاجية وجدت بنسبة 75.3% في الغشاء الحيوي المتكون على الشرائح الزجاجية في حين شكلت البكتريا الموجبة لصبغة كرام نسبة 24.7%. تواجدت البكتريا المتحركة بنسبة 66.7% والبكتريا غير المتحركة بنسبة 33.3%(شكل -17) وهذه النتيجة تؤكد مجدداً كون البكتريا السالبة لصبغة كرام والمتحركة تمتلك فرصة أكبر لتكوين الغشاء الحيوي من البكتريا الموجبة لصبغة كرام وغير المتحركة. اتفقت هذه النتائج مع ما توصلت إليه الكثير من الدراسات منها دراسة O'Toole وجماعته (2000b) الذي أكد على أهمية الأهداب في تكوين الغشاء الحيوي عند دراسة عملية تكونه بوساطة *P.aeruginosa*. أكد Tolker-Nielsen وجماعته (2000) على أنّ الحركة تلعب دور مهم في بناء الغشاء الحيوي والبكتريا المتحركة تمتلك فرصة اكبر لتكوينه من غير المتحركة وبين أنّ وجود وسائل الالتصاق على أسطح الخلايا وتكاثر الخلايا الملتصقة وإفرازها لـ EPS يساهم في تكوين الغشاء الحيوي وأشار O'Toole وجماعته (2000a) الى أنّ البكتريا السالبة لصبغة كرام تتواجد في الغشاء الحيوي اكثر من البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبين أنّ البكتريا الأخيرة تلتصق بوساطة بروتينات المحفظة أو بروتينات الالتصاق وهذا يخص البكتريا غير المتحركة أيضاً في حين البكتريا السالبة لصبغة كرام والبكتريا المتحركة تلتصق بوساطة الأسواط والأهداب.

للتعرف على ميكانيكية تكون الغشاء الحيوي تم الاعتماد على تحديد العدد البكتيري الكلي للبكتريا الملتصقة في كل مدة زمنية فوجد أنّ هنالك تزايداً في أعداد البكتريا الملتصقة على الشرائح الزجاجية مع زيادة المدة الزمنية وكما هو مبين في شكل 3-15.

إنّ معدل TPC اللوغاريتمي في الشرائح المحسوب في المدد الزمنية الآتية 0، 2، 4، 6، 24، 26، 28 و 48 ساعة كان 1.1، 3.1، 3.36، 3.49، 5.22، 5.34، 5.56 و 6.64 خلية/مليلتر على التوالي. أنّ هذه الزيادة التدريجية تشير إلى حصول زيادة في أعداد البكتريا ناتجة عن نمو وتكاثر البكتريا الملتصقة أولاً من جهة وازدياد أعداد البكتريا المضافة لسطح الالتصاق من جهة أخرى.

تم إجراء فحص تحليل التباين Analysis of variance (ANOVA) لمعرفة أنْ كانت هناك فروقات معنوية بين الأعداد البكتيرية الكلية اللوغاريتمية في المدد الزمنية المختلفة فوجد أنّ هناك فرقاً معنوياً كبيراً بنسبة 1% وهذا يشير إلى أنّ للمدد الزمنية المختلفة تأثيراً كبيراً في الأعداد البكتيرية الكلية اللوغاريتمية إذ وجد أنّ الأعداد تزداد مع زيادة المدة الزمنية بعلاقة طردية.

عكست نتائج التحليل الإحصائي لإيجاد اقل فرق معنوي مهم إحصائياً (LSD) Least significant deference بين الأعداد البكتيرية الكلية اللوغارتيمية للبكتريا الملتصقة على الشرائح الزجاجية في المدد الزمنية المختلفة ومن هذا وجد أنّ هنالك فروقات معنوية كبيرة بينهما في معظم العينات إلا أنّ اقل فرق معنوي وجد بين TPC اللوغاريتمي المحسوب في المدة 28 ساعة و 48 ساعة. في حين كانّ اكبر فرق معنوي بين TPC اللوغاريتمي المحسوب في مدة الصفر و 48 ساعة وعند مستوى معنوية 1%.

لوحظ من خلال النتائج أنّ أعداد البكتريا على سطوح الشرائح الزجاجية ازدادت في حين كانت ظروف الوسط لاتسمح بهذه الزيادة نتيجة تكون ظروف غير ملائمة للنمو منها نقص المغذيات وانخفاض الرقم الهيدروجيني نتيجة وجود بعض العزلات البكتيرية المخمرة لسكر اللاكتوز والمنتجة للحامض وتعلل هذه الزيادة بتكّون الغشاء الحيوي الذي يكون بمثابة طبقة واقية تحمي البكتريا من التأثيرات البيئية (Schmid *et al.*, 2002) وهذه الطبقة هي EPS (Baillie and Douglas, 1999). تطابقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Costerton وجماعته (1999) وEspinosa-Urgel (2003) إذ أشاروا إلى أنّ أعداد البكتريا تزداد عند تكون الغشاء الحيوي وذلك لأنه يضمن لها حماية من التأثيرات البيئية وبينوا أنه بعد الالتصاق تتكون مستعمرات مجهرية التي بدورها تزداد حجماً نتيجة التكاثر البكتيري وتتميز تدريجياً إلى غشاء حيوي ناضج.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

أظهرت النتائج ما يأتي:

1. إن العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام هي الملوثات السائدة في الحليب.
2. إن للتغاير الفصلي تأثير معنوي في العدد البكتيري الكلي الذي وجد انه يزداد في الأشهرالحارة وأشارت النتائج الى وجود علاقة ارتباط عكسية بين العدد البكتيري الكلي وقيم pH.
3. إن الغشاء الحيوي قد تكون على جدار حاويات الحليب والشرائح الزجاجية.
4. إن العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام والمتحركة هي السائدة في تكوين الغشاء الحيوي.
5. إن بكتيريا *E. coli*، *Pseudomonas* و *Enterobacter* هي اكثر الأنواع البكتيرية الملتصقة أولاً على الشرائح الزجاجية.

وتوصي الدراسة بما يأتي:

1. إن تقوم الجهات الصحية بالسيطرة التامة على عملية تداول الحليب وذلك بعمل فحوصات دورية عليه للتأكد من صلاحيته للاستهلاك البشري.
2. نظراً لوجود بعض العزلات البكتيرية الممرضة في الحليب لذا يجب ان تعتبر من ضمن المحددات الصحية المعمول بها لقبول الحليب.
3. القيام بفحص دوري لحاويات الحليب للتأكد من عدم تكون الأغشية الحيوية.
4. إجراء دراسات وراثية مستفيضة للتعرف على الاسس الوراثية التي يتكون فيها الغشاء الحيوي .
5. اجراء دراسة لاجاد منظفات تعمل على ازالة هذه الاغشية.

جدول-1: الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت علىالعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من الحليب الخام

الاختبار / العزلة البكتيرية	صبغة كرام	إنتاج انزيم Catalase	إنتاج انزيم Oxidase	إنتاج انزيم Haemolysin	النمو على وسط المانيتول الملحي	اختبار الحركة	اختبار الاكسدة و التخمر	تحلل اليوريا	اختبار الفوكس بروسكاور	اختبار المثيل الأحمر	استهلاك السترات	إنتاج الإندول	النمو على وسط كلغلر الصلب	الكشف عن إنزيم الفنيل الانين	موقع البوغ	تخمر السكريات								استهلاك الحوامض الأمينية	
																كلوكوز	لاكتوز	سكروز	مانيتول	زايلوز	تريهالوز	مانوز	مالتوز	الأرجنين	اللايسين
Staphylococcus aureus	+	+	-	β	+	-	ت	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S. xylose	+	+	-	β	+	-	ت	+	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
S. epidermidis	+	+	-	-	+	-	ت	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Micrococcus lylae	+	+	+	-	+	-	أ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-
M. luteus	+	+	+	-	+	-	أ	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-	+	-	-
Streptococcus agalactiae	+	-	-	β	-	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-
S. bovis	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+
S. salivarius	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Bacillus cereus	+	+	+	β	-	+	ت	+	+	+/-	+	-	ح/ق	-	م	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
B. firmus	+	+	+	α, β	-	+	أ	-	-	+	-	-	ق/ق	+	م/ش ط	+	-	-	+	+/-	+	-	+	+	-
Listeria gragi	+	+	-	-	-	+	ت	-	+	+	+	-	ح/ق	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
L. welshimeri	+	+	-	-	-	+	ت	-	+	+	-	-	ح/ق	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-

المختصرات: ت: تخمر؛ أ: أكسدة؛ ح: حامض؛ ق: قاعدة؛ م: مركزي؛ م/ ش ط :مركزي/ شبه طرفي؛ β: تحلل الدم من نوع بيتا؛ α: تحلل الدم من نوع ألفا؛ -: نتيجة سالبة؛ +: نتيجة موجبة؛ +/-: غالبية العزلات سالبة؛ -/+: غالبية العزلات موجبة.

جدول-2: الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت علىالعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام العائدة للعائلة المعوية المعزولة من الحليب الخام

العزلة البكتيرية / الاختبار	صبغة كرام	إنتاج انزيم Catalase	إنتاج انزيم Oxidase	إنتاج الإندول	اختبار المثيل الأحمر	اختبار الفوكس بروسكور	استهلاك المالونيت	استهلاك السترات	تحلل اليوريا	اختبار الحركة	استهلاك الأحماض الأمينية: الлايسين	استهلاك الأحماض الأمينية: الأرجنين	الكشف عن أنزيم الفنيل الانين (الالانين)	إنتاج انزيم Haemolysin	النمو على وسط كلغلر الصلب	إنتاج H_2S	اختبار الأكسدة و التخمر	تخمر السكريات: كلوكوز+غاز	لاكتوز	مانيتول	مالتوز	مانوز	سكروز	زايلوز	تريهالوز	سوربيتول
Escherichia coli	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-/β	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	+
Klebsiella pneumoniae	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+\-	+	+	+
K. oxytoca	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	β	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	+
K. terrigena	-	+	-	-	+	+	+	-/+	-	-	+	-	-	-	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	-	+
Enterobacter aerogenes	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	+
E. gergoviae	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	α	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	-
E. amnigenus	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	β	ق/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	-
E. hermaechei	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	ق/ح	-	ت	+/+	+\-	+	+	+	+	+	+	-
E. sakazakii	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	+
E. agglomerans	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	ح/ح	-	ت	+/+	+	+	+	+	+	+	+	-\+
Yersinia enterocolitica	-	+	-	-\+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	β	ق/ح	-	ت	+	-	+	-\+	+	+	-\+	+	+
Salmonella choleraesuis	-	+	-	-	+	-	+	+/-	-	+	+	+	+	-	ق/ح	+	ت	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Shigella sonnei	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-/+	-	β	ق/ح	-	ت	+	-	+	+	+	-/+	-\+	-	-
Proteus vulgaris	-	+	-	+	+	-	-	+\-	+	+	+	-	+	-	ق/ح	+	ت	+/+	-	+/-	+/-	-/+	+	+	+	-
Citrobater amalonaticus	-	+	-	+	+	-		+	+\-	+	-	-\+	-	-	ح/ح	-	ت	+/+	+/-	+	+	+	+	+	+	+

المختصرات: ت: تخمر؛ ح: حامض؛ ق: قاعدة؛ β: تحلل الدم من نوع بيتا؛ α: تحلل الدم من نوع ألفا؛ -: نتيجة سالبة؛ +: نتيجة موجبة؛ +/-: غالبية العزلات سالبة؛ -/+: غالبية العزلات موجبة.

جدول-3: الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت علىالعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام غير المعوية المعزولة من الحليب الخام

الاختبار	صبغة كرام	انتاج انزيم Catalase	انتاج انزيم Oxidase	انتاج الأندول	اختبار المثيل الأحمر	اختبار الفوكس بروستاور	استهلاك السترات	تحلل اليوريا	اختبار الحركة	استهلاك الحوامض الأمينية	الكشف عن انزيم الفنيل	انتاج انزيم Haemolysin	النمو على وسط كلغلر الصلب	انتاج H_2S	اختبار الأكسدة و التخمر	تخمر السكريات

العزلة البكتيرية										اللايسين	الأرجنين						كلوكوز	لاكتوز	مانيتول	مالتوز	مانوز	سكروز	زايلوز	تريهالوز	سوربيتول
Aeromonas caviae	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	ح/ح	-	ت	+	+	+	+	+	+	-	+	-
A. salmonicida	-	+	+	+	+	-\+	-	-	+	+	+	-	β	ح/ح	-	ت	+	-	-	+	+	+	-	+	-\+
Brucella melitensis	-	+	+	-	+	-\+	-	+	-	-	-	-	-	ح/ح	-	-	+	+	+\-	+	+	+	-	+	-
Pseudomonas aeruginosa	-	+	+	-	-	-	+	+\-	+	-	+	-	-	ق/ق	-	أ	+	-	-	-	-	+	-	-	-
P. alcaligenes	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	ق/ق	-	أ	-	-	-	-	-	-	+\-	-	-
Alcaligenes faecalis	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	ق/ق	-	أ	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Neisseria flavescens	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	ق/ق	-	أ	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N. canis	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	ق/ق	-	-	-	-	-	-	-	-	+\-	-	-

المختصرات: ت: تخمر؛ أ: أكسدة؛ ح: حامض؛ ق: قاعدة؛ β: تحلل الدم من نوع بيتا؛ -: نتيجة سالبة؛ +: نتيجة موجبة؛ +/-: غالبية العزلات سالبة؛ -/+: غالبية العزلات موجبة.

المصادر العربية

الراوي، خاشع محمود 1992. المدخل إلى الإحصاء. كلية الزراعة. جامعة الموصل. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.
عبود، أكرم ريشان والصواف، سناء داود وحمد، ضاري عليوي 1991. صحة الغذاء. مطبعة جامعة الموصل.
مهدي، معتز عبد الواحد عبد المنعم2001. دور بعض أنواع البكتريا الهوائية المكونة للأبواغ في فساد الحليب. رسالة دكتوراه مقدمة الى كلية الطب البيطري. جامعة بغداد.

References

Abdulla, S.M. and Musleh, R.M. 1988. Bacterial contamination of soft white cheese and cheese-processing plant with special reference to psychrophytic Pseudomonads. J. Bio. Sci. Res. *19(1):* 1-12.

Abdulla, F.A.; Khudor, M.H. and Muhsen, R.K. 2002. Microbiological study of subclinical mastitis of cows in Basra city. Al-Qadisiya J. Vet. Med. Sci. *1(2):* 44-49.

Abou-Donia, S.A. and El-Soda, M.A. 1986. Egyption soft pickled ripened mish cheese. Ind. J. Dai. Sci. *39*:1-5.

Adams, D.M.; Barach, J.J. and Speck, M.L. 1975. Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. J. Dai. Sci. *58*: 828-834.

Aggarwal, P.K. and Srinivasan, R.A. 1986. Influence of *Bacillus cereus* on the keeping quality of pasteurized milk. Ind. J. Dai. Sci. *39:* 95-97.

Ahmed, A.A.; Mustafa, M.K. and Marth, E.H. 1983. Incidence of *Bacillus cereus* in milk and some milk products. J. Food Prot. *46(2):*126-128.

Al-Graibawi, M.; Yousif, A. and Alizzi, S. 1985. Isolation of bacteria from sheep milk and phage typing of *Staphylococcus aureus* isolates. Haryana Vet. *XXIV (1,2):* 15-19.

Allison, D.A. and Sutherland, I.W. 1987. The role of exopolysaccharide -s in adhesion of freshwater bacteria. J. Gen. Microbiol. *133:* 1314 -1327.

Allison, D.G. 1998. Exopolysaccharide production in bacterial biofilms. Biofilm J. *3*:1-19.

Al-Thwani, A.N. 1994. Identification and antibiotic sensitivity patters of bacteria isolated from raw and mastitis milk at one of Baghdad cow-rearing atrian. Vet. J. *4(5):* 90-102.

Anderson, C.M. 1982a. Factors affecting the distribution of lipoprotein lipase activity between serum and casein micelles in bovine milk. J. Dai. Res. *49:* 51-59.

Anderson, J.C. 1982b. Progressive pathology of Staphylococcal mastitis with anote on control immunization and therapy. Vet. Rec. *110:* 372-379.

Angelotti, R.; Milton, J.F. and Lewis, K.H. 1961. Time-temperature effects on *Salmonella* and Staphylococci in foods. Appl. Microbiol. J. *9:* 308-315.

Atmaca, S.; Elci, S. and Akpolat, N.O. 2000. Differential production of slime by *Staphylococcus saprophyticus* under aerobic and anaerobic conditions. J. Med. Microbiol. *49:* 1051-1052.

Baillie, G.S. and Douglas, L.J. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J. Med. Microbiol. *48(7)*: 671- 679.

Baron, E.J.; Peterson, L.R. and Finegold, S.M. 1990 .Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. The C-V Mosby Company. New-York, USA.

Baron, C.; Howard, M. and Turner, L. 1994. Medical Microbiology. 2nd ed. Wiley-liss. New York, USA.

Bassler, B.L.; Greenberg, E.P. and Stevens, A.M. 1997. Cross- species induction of luminescence in the quorum sensing bacterium *Vibrio harveyi*. J. Bacteriol. *179(12):* 4043-4045.

Bassler, B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene experession by quorum sensing. Curr. Opin. Microbiol. *2:* 582-587.

BBL Manual of Products and Laboratory Procedures. 1973. 6thed. Division of Becton, Dickinson and company. Cockeysville, Mary-land. USA. pp:26-132.

Bennet, R.W.; Yeterian, M.; Smith, W. and Coles, C.M. 1986. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and entero-toxigenicity. J. Food Sci. *51(5):* 1337-1339.

Benson, H.J. 1998. Microbiological Applications: A laboratory Manual in General Microbiology. 7thed. McGraw-Hill Companies. California, USA. pp: 169.

Bhattacharyya, R.N. 1993. Experiments with Microorganisms. 1st ed. Em -kay Publications. Delhi, India. pp: 41-250.

Boddie, R.L. and Nickerson, S.C. 2002. Reduction of mastitis caused by experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* by use of aquaternary ammonium and halogen-mixture teat dip. J. Dai. Sci. *85*: 258-262.

Bradshaw, J.G.; Peeler, J.T.; Corwin, J.J.; Hunt, J.M. and Twedt, R.M. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy pro-ducts. J. Food Prot. *50(7):* 543-544.

Bradshaw, L.J. 1992. Laboratory Microbiology. 4th ed. Saunders Colle-ge Publishing. California, USA. pp: 183-338 and 417.

Bradshaw, D.J.; Marsh, P.D.; Allison, C. and Schilling, K.M. 1996. Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. Microbiol. J. *142:* 623-629.

Calsamiglia, S.; ferret, A. and Devant, M. 2002. Effects of pH and pH flu-ctuations on microbial fermentation and nutrient flow from adual-flow continuous culture system. J. Dai. Sci. *85*: 574-579.

Chao, L. and Ramsdell, G. 1985. The effects of wall population on coe-xistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. *131*: 1229-1236.

Chmielewski, R.A. and Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. J.CRFSFS. *2:* 22-32.

Cloete, T.E.; Jacobs, L. and Brozel, V.S. 1998. The chemical control of biofouling in industrial oil-water systems. Biodeg. *9:* 23-37.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. 1996. Practical Medical Microbiology. 14thed. Churchill Living stone Inc. New York, USA.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. Sci. J. *284(5418):* 1318-1322.

Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrophilic microorganism in milk and dairy product. J. Food Prot. *45:* 172-179.

Cruickshank, R.; Duguid, J.R.; Marmion, B.P. and Swain, R.H. 1975. Medical Microbiology. 12thed. Churchill Living Stone Inc. New York, USA. pp: 412-480.

Danese, P.N.; Pratt, L.A. and Kolter, R. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coil* K.12 biofilm architecture. J. Bacteriol. *182:* 3593-3596.

Davey, M.E. and O'Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. J. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *64(4):* 847-867.

Davies, D.G.; Parsek, M.R.; Pearson, J.P.; Lglewski, B.H.; Costerton, J. W. and Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. J. Sci. *280:* 295-298.

Debus, O. 1995. Transport and reaction of aromatics, O_2 and CO_2 within a membrane bound biofilm in competition with suspended biomass. J.Water Sci. Tech. *31(1):* 129-141.

Deibel, V. 2000. Biofilms. Internet J. of food safety. *1*: 6-7.

Desai, P.P. and Nataragan, A.M. 1981. Bacteriological quality of raw milk collected fram societies form transportation to chilling centres. Dai. Sci. *10:* 4-8 (Abs).

Difco Manual of Dehydrated Culture media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures. 1975. 10thed. Difco Laboratories, Detroit. Michigan, USA. pp:35-90.

Dobell, C. 1960. Antony Van Leeuwenhoek and His Little Animals. Dover Publications Inc. London, UK. pp: 237-238.

Donlan, R.M. 2002. Biofilm: microbial life on surfaces. J. Emereging Infectious Diseases. *8(9):* 881-890.

Eden, R.F.; Rosen, B. and Mannheim, C.H. 1977. Death and injury of *Staphylococcus aureus* during thermal treatment of milk. Can. J. Microbiol. *23*: 1034-1037.

El-Bably, M.A. and Ali, M.M. 1997. Efficacy evaluation of new teat dip formulation (Cyteal) for control of bovine mastitis under experimental and field conditions. Vet. Med. J. Giza. *45(3):* 419-426.

El-Gamal, A.M. 1997. Incidence of motile *Aeromonas* spp. in raw milk and some dairy products. Vet. Med. J. Giza. *45(3):* 353-360.

Ellis, P. and Meldrum, R. 2002. Comparison of the compact dry TC and 3 M petrifilm ACP dry sheet media methods with the spiral plate method for the examination of randomly selected foods for obtainins aerobic colony counts. J. Food. Prot. *65(2):* 423-425. (Abs)

El-Said, W.A.; El-Danaf, N.A.; Tanios, A.I.; Selim, R.S. and Khafagy, A. A. 1997. *Yersinia enterocolitica*: virulence markers and antibiogram. Vet. Med. J. Giza. *45(3):* 369-376.

Espinosa-Urgel, M. 2003.Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. J. Bacteriol. *185(3):* 699-700.

Feltham, K.A.; Power, A.K.; Pell, P.A. and Sneath, P.H. 1978. A simple method for storage of bacteria. J. Appl. Bacteriol. *44:* 313-316.

Fisher, C. and Scott, T.R. 1997. Food Flavours: Biology and Chemistry. The Royal Society of Chemistry. London, UK. pp: 51-147.

Flint, S.H.; Brooks, J.D. and Bremer, P.J. 1997a. Use of the malthus conductance growth analyser to determine number of thermophilic Streptococci on stainless steel. J. Appl. Microbiol. *83:* 335-339.

Flint, S.H.; Brooks, J.D. and Bremer, P.J. 1997b. The influence of cell surface properties of thermophilic Streptococci on attachment to stainless steel. J. Appl. Microbiol. *83:* 508-517.

Flint, S.H., Bremer, P.J. and Brooks, J.D. 1997c. Biofilms in dairy manufacturing plant description, current concerns and methods of control. J. Biofouling. *11(1):* 81-97.

Garbutt, J. 1997. Essentials of Food Microbiology. Arnold, member of the hodder headline group. London, UK. pp: 128-236.

Garcia, M.L.; Moreno, B. and Bergdoll, M.S.1980. Characterization of Staphylococci isolated from mastitic cows in Spain. Appl. Environ. Microbiol. *39(3):* 548-553.

Goel, M.C.; Kulshresth, D.C.; Marth, E.H.; Francis, D.W.; Bradshaw, J.G. and Read, R.B. 1970. Fate of coliform in yogurt, buttermilk, sour cream and cottage cheese during refrigerated storage. J. Food Sci. *35(2):* 54-59.

Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. 1989a. Growth of *Staphylococcus aureus* in milk and creams with various amounts of milk fat. J. Food Prot. *52(8):* 540-543.

Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. 1989b. Growth and production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* in creams. J. dai. Sci. *72:* 2266-2275.

Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. 1989c. Fate of *Staphylococcus aureus* in butter. Milchwissenschaft. *44(9):* 551-555.

Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. 1990a. Characterization of strains *Staphylococc us aureus* by their lipolytic activity on various agar media. J. Food Sci. *55(2):* 591-592.

Halpin-Dohnalek, M.I. and Marth, E.H. 1990b. Fate of *Staphylococcus aureus* in anemulsion and aspread made of milk fat and vegetable fat. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. *23:* 242-245.

Harris, R.F. and Sommers, L.E. 1968. Plate-dilution frequency technique for assay of microbial ecology. Appl. Microbiol. *16(2):* 330-334.

Henrici, A.T. 1933. Studies of fresh water bacteria. A direct microscopic technique. J.Bacteriol. 25: 277-287. (cited by Davey and Otoole, 2000).

Hill, A.W. and Shears, A.L. 1979. Recurrent coliform mastitis in the dairy cow. Vet. Rec. *105*: 299-301.

Hirvonen, J.; Eklund, K.; Teppo, A.M.; Huszenicza, G.; Kulcsar, M.; Saloniemi, H. and Pyörälä, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. Acta Vet. Scand. *40:* 35-46.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9thed. Lippin Cott Williams and Wilkins. Baltimore, USA.

Huszenicza, G.; Kegl, T.; Kulcsar, M.; Olah, B.; Gacs, M.; Oppel, K.; Stollar, Z.; Jonsson, P. and Janosi, S. 1997. Diagnostic value of certain mastitis markers in following up the clinical and bacteriological changes in pharmacotherapeutic studies. Acta. Vet. Hungarica. *45(4):* 409-416.

ICMSF. 1998. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 1sted. Blackie Academic and Professional. London, UK. pp: 521-532.

Ingalls, W. 2000. Milk Quality Issues Practical Considerations. West Agro Inc. Kansas, USA.

Jackman, D.M.; Patel, T.R. and Haard, N.F. 1985. Effect of heat-stable proteases on the kinetic parameters of milk clotting by chymosin. J. Food Sci. *50:* 602-609.

Jay, J.M. 1970. Modren Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold Company. New York, USA.

Jass, J.; Costerton, J.W. and Lappin-Cott, H.M. 1995. The effect of electrical currents and tobramycin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. J. Ind. Microbiol. *15(3):* 234-242.

Jessen, A.B., and Lammert, O.L. 2001. Biofilm and Disinfection in Meat Processing Plants. 2nd International Symposium on Disinfection and Hygine. Wageningen, Holland.

Kolari, M. Nuutinen, J. and Salkinoja-Salonen, M. 2001. Mechanisms of biofilm formation in paper machine by *Bacillus* species: the role of *Deinococcus geothermalis*. J. Ind. Microbiol. Biotech. *27*: 343-351.

Kornacki, J.L. and Marth, E.H. 1989. Thermal inactivation of *Staphylococcus aureus* in retentates from ultrafiltered milk. J. Food Prot. *52(9)*: 631-637.

Koupal, A. and Deibel, R.H. 1978. Rapid qualitative method for detecting Staphylococcal nuclease in foods. Appl. Environ. Microbiol. *35*: 1193-1197.

Kovaks, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature. *178:*703.

Kuczaj, M. 2001. Interrelations between year season and raw milk hygienic quality indices. Elec. J. of Polish Agri.Uni. *4(1)*: 127-135.

Kumar, C.G. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. A review. Int. J. Food Microbiol. *42*: 9-27.

Kuwajock, V.L.; Bagadi, H.O.; Shears, P. and Mukhtar, M.M. 1999. Prevalence of multiple antibiotic resistance among bovine mastitis pathogens in Khartoum state, Sudan. Sud. J. Vet. Sci. Anim. Husb. *38(1,2)*: 64-70.

Langley, S. and Beveridge, T.J. 1999. Metal binding by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is influenced by growth of the cells as a biofilm. Can. J. Microbiol. *45*: 616-622.

Langlois, B.E.; Parlindungan, A.K.; Harmon, R.J. and Akers, K. 1990. Biochemical characteristics of *Staphylococcus* species of human and bovine origin. J. Food Prot. *53(2)*: 119-126.

Lawrence, J.R.; Korber, D.R.; Wolfaardt, G.M. and Caldwell, D.E. 1997. Analytical Imaging and Microscopy Techniques. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C.J.; Knudsen, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and walter, M.V. (eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. pp: 29-47.

Lee, W.C.; Chao, B.C.; Kim, J.J.; Lee, S.M. and Sony, T.O. 1985. Study of quality of raw milk in Korea. J. Vet. Pub. Health. *9:* 710-715.

Lee-Wong, A.C. 1994. Biofilms in cheese processing environments. Marschall Italian and Specialty Cheese Seminars. *5*: 1-5.

Macfaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rded. Lippin Cott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.

Majewski, T. 1987. The level of certain milk components in acute mastitis. Polskie Archiwum Weterynaryjne. *25:*9-15.

Marshall, K.C.; Stout, R. and Mitchell, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. J. Gen. Microbiol. *68*: 337-348.

Marshall, K.C. 1997. Colonization, Adhesion and Biofilms. In: Manual of Environmental Microbiology. Hurst, C.J.; Knudesn, G.R.; McInerney, M.J.; Stetzenbach, L.D. and Walter, M.V. (eds). American Society for Microbiology. Washington, D.C. USA. pp: 358-362.

Marth, E.H. 1978. Standard Methods for Examination of Dairy Products. 14thed. American Public Health Association. Washington, D.C., USA.

Matos, J.S.; White, D.G.; Harmon, R.J. and Langlois, B.E. 1991. Isolation of *Staphylococcus aureus* from sites other than the lactating mammary gland. J. Dai. Sci. *74(5)*: 1544-1549.

Mckinnon, C.H.; Bramley, A.J. and Morant, S.V. 1988. Aninline sampling technique to measure the bacterial contamination of milk during milking. J. Dai. Res. *55*: 33-40.

Mehlman, I.J. and Romero, I.A. 1982. Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. J. Food Tech. *36(3)*: 73-79.

Miller, M.B. and Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *55*: 165-199.

Mitchell, R. 1993. Environmental Microbiology. 3rd ed. Wiley-liss Inc. Brisbane, USA. pp: 278-283.

Mittelman, M.W. 1998. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. J. dai. Sci. *81:* 2760-2764.

Mohamed, I.E.; Elowni, O.A. and Mohamed, G.E. 1999. The effect of mastitis on milk yield of Friesian cattle in Sudan. Sud. J. Vet. Sci. Anim. Husb. *38(1,2)*: 131-136.

Murphy, T.F. and Kirkham, C. 2002. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen, expression and role of pili. BMC Microbiol. *2*: 7-21.

Nakae, T.; Kataoka, K.; Miyamota, T. and Segawa, K. 1978. On the quality of raw milk in Okayama prefecture (Japan). J. Dai. Sci. *43*: 6-11.

Novick, R.P. and Muir, T.W. 1999. Virulence gene regulation by peptides in Staphylococci and other Gram positive bacteria. Curr.Opin. Microbiol. *2:* 40-45.

Otero, A.; Garcia, M.C.; Garcia, M.L.; Prieto, M. and Moreno, B. 1988. Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains, producers of enterotoxins C_1 or C_2, during the manufacture and storage of burgos cheese. J. Appl. Bacteriol. *64*: 117-122.

O'Toole, G.; Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000a. Biofilms formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. *54*: 49-79.

O'Toole, G.A; Gibbs, K.A.; Hager, P.W.; Phibbs, P.V. and Kolter, R. 2000b. The global carbon metabolism regulator *CrcIs,* a component of signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. *182(2)*: 425-431.

Pamela, B. 1996. Enterbacteriaceae. In: Practical Medical Microbiology. Collee, J.G; Fraser, A.G. and Marmion, B.P.(eds). 14thed. Churchill Living Stone. New York, USA.

Prakash, S. and Kulkarni, P.R. 1986. Antimicrobial activity of dahi. Ind. J. dai. Sci. *39*: 97-100.

Prescott, L.M.; Harley, J.P. and Klein, D.A. 1990. Microbiology. Brown Publishers. Boulevard, USA. pp: 846-850.

Pulcini, E.D. 2001. Biofilms: sensing and signaling. J. Cal. Den. Ass. *29(9)*: 194-198.

Ren, D.; Sims, J.J and Wood, T.K. 2002. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-Furanone. Let. Appl. Microbiol. *34*: 293-299.

Reanney, D.C.; Gowland, P.C. and Slater, J.H. 1983. Genetic Interactions A mong Microbial Communities. In: Microbes in their Natural Environments. Sleter, J.H.; Whittenburg, R. and Wimpenny, J.W. (eds). 1sted. Society for General Microbiology. London,UK. pp: 378-381.

Saleh, Y.E.; El-Fouly, M.Z. Khalil, M.S. and Abo-state, M.A. 1993. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolated from Egyption foods. Qatar uni. Sci. J. *13*: 75-80.

Santos, E.C.; Genigeorgis, C. and Farver, T.R. 1981. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commerical manufacturing of Brazilian minas cheese. J. Food Prot. *44(3):* 172-176.

Schaik, G.V.; Lotem, M. and Schukken, Y.H. 2002. Trends in somatic cell counts, bacterial counts and antibiotic residue violations in NewYork state during 1999-2000. J. Dai. Sci. *85*: 782-789.

Schmid, T.; Panne, U.; Haisch,C.; Hausner, M. and Niessner, R. 2002. Aphotoacoustic technique for depth-resolved in sita monitoring of biofilms. Environ. Sci. Tech. *36(19):* 4135-4141.

Singleton, P. 1997. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine.4th ed. John Wiley and Sons. London, UK. pp: 216-372.

Spoering, A.L. and Lewis, K. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. J. Bacteriol. *183(23):* 6746-6751.

Stadhouders, J.; Hassing, F. and Galesloot, T.E. 1980. A rapid and simple method for the detection of *Staphylococcus aureus* thermonuclease in cheese. Neth. Milk. Dai. J. *34*: 199-204.

Stern, N.J. 1982. *Yersinia enterocolitica*: recovery from foods and virulence characterization. J. Food Tech. *36(3):* 84-88.

Stukus, P.E. 1997. Investigating Microbiology: A laboratory Manual for General Microbiology. Harcourtbrace and Company. Philadelphia, USA. pp: 169-467.

Sutherland, I.W. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. J. Microbiol. *197*: 3-9.

Takemura, K.; Hogan, J.S. and Smith, K.L. 2003. Effect of immunoglobulin G from cows immunized with ferric citrate receptor (FecA) on iron uptake by *Escherichai coli*. J. Dai. Sci. *86*: 133-137.

Tibana, A.; Warnken, M.B.; Nunes, M.P.; Ricciardi, I.D. and Noleto, A.S. 1987. Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio De Janeiro, Brazil. J. Food Prot. *5(8):* 580-583.

Tolker-Nielsen, T.; Brinch, V.C.; Ragas, P.C.; Andersen, J.B.; Jacobsen, C.S. and Molin, S. 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. J. Bacteriol. *182(22):* 6482-6489.

Thomas, C.T.; White, J.C. and Longree, K. 1966. Thermal resistance of *Salmonella* and Staphylococci in foods. Appl. Microbiol. J. *14(5):* 815-820.

Walker, G.C. and Harmon, L.G. 1966. Thermal resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey and phosphate buffer. Appl. Microbiol. *14(4):* 584-590.

Wardell, J.N.; Brown, C.M. and Flannigan, B. 1983. Microbes and Surfaces. In: Microbes in their Natural Environments. Slater, J.H.; Whittenburg, R. and Wimpenny, J.W.(eds). 1st ed. Society for General Microbiology. London, U.K. pp: 351-361.

Watts, J. 2000. Contaminated milk scare leaves sour teste among consumers. Lancet J. *356*: 573.

Wenz, j.R.; Barrington, G.M.; Garry, F.B.; McSweeney, K.D.; Dinsmore, R.P.; Goodell, G. and Callan, R.J. 2001. Bacteremia associated with naturally occuring coliform mastitis in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Ass. *219(7):* 976-981.

Werner, B.G. and Hotchkiss, J.H. 2002. Effect of carbon dioxide on the growth of *Bacillus cereus* spores in milk during storage. J. Dai. Sci. *85*: 15-18.

Whang, D.W. and Cho, J. 1981. Psychrotrophic bacteria in milk. Dai. Sci. *44:* 5-7.

WHO. 1984. Operation and Control of Food and Water Pollution. EIES CWA /NR.

Wilson, C.D. and Richards, M.S.1980. A survey of mastitis in the British dairy herd. Vet. Rec. *106*: 431-435.

Wimpenny, J. 2000. Anoverview of Biofilms as Functional Communities. In: Community Structure and Cooperation in Biofilms. Allison, D.G.; Gilbert, P.; Lappin Scott, H.M. and Wilson, M. (eds). The Society for General Microbiol. London, UK. pp: 1-19.

Wistreich, G.A. and Lechtman, M.D. 1980a. Microbiology. 3rded. Glencoe Publishing Co. Inc. London, USA. pp: 356-369.

Wistreich, G.A. and Lechtman, M.D. 1980b. Laboratory Exercises in Microbiology. 4thed. Glencoe Publishing Co. Inc. California, USA. pp: 263-288.

Yoo, J.A. and Chen, X.D. 2002. Anemission pattern of thermophilic bacteria attached to or imbedded in porous supports. Int. J. Food Microbiol. *73(1):* 11-21. (Abs)

Zemelman, R. and Longeri, L. 1965. Characterization of Staphylococci isolated from raw milk. Appl. Microbiol. *13(2):* 167-170.

Zobell, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. *46*: 39-56. (Cited by Wardell, 1983).

Zottola, E.A. 2001. Reflections on *Salmonella* and other wee beasties in foods. J. Food Tech. *55(9):* 60-67.

الملاحق

ملحق1: تحليل التباين لتأثير مدة الخزن في ازدياد اعداد البكتريا المكونة للغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية

مصدر التباين S.V	مجموع المربعات S.S	درجة الحرية D.F	متوسط المربعات M.S	F محسوبة	F جدولية تحت مستوى معنوية1%	اقل فرق معنوي
Treatment	154.6	7	22.1	110.5	3.124	1.08
Error	8.3	48	0.2			
Total	162.9	55				

المحتويات

ت	العنوان	رقم الصفحة
	الخلاصة	**I**
	المحتويات	III
	قائمة الاختصارات	VI
	قائمة الأشكال	VII
	قائمة الجداول	VIII
	الملاحق	VIII
1.	**الفصل الأول: المقدمة واستعراض المراجع**	
1.1	مقدمة عامة	1
2.1	البكتريا المتواجدة في الحليب الخام	3
3.1	نوعية وكمية البكتريا الملوثة للحليب الخام	4
1.3.1	مجموعة العائلة المعوية	5
2.3.1	بكتريا المكورات العنقودية الذهبية	6
3.3.1	البكتريا الأخرى الملوثة للحليب الخام	8
4.1	النشاط البكتيري في الحليب الخام	10
1.4.1	مشاكل نوعية	10
2.4.1	مشاكل صحية	11
5.1	تأثير فصول السنة في المحتوى البكتيري للحليب الخام	13
6.1	مصادر تلوث الحليب الخام	13
1.6.1	التهاب الضرع	14
2.6.1	العاملين	15
3.6.1	الحاويات	15
7.1	الغشاء الحيوي	16
1.7.1	نبذة تاريخية عن الغشاء الحيوي	17
2.7.1	طرائق دراسة الغشاء الحيوي	18
8.1	ميكانيكية تكون الغشاء الحيوي	19
1.8.1	تكوين الغشاء المتكيف	20
2.8.1	الارتباط	21
3.8.1	تكوين المستعمرات المجهرية ونضج الغشاء الحيوي	24
4.8.1	الانفصال	25
9.1	الاتصال البكتيري	25
10.1	نماذج الغشاء الحيوي	27
11.1	أهمية الغشاء الحيوي	27
12.1	العلاقة بين الغشاء الحيوي والحليب	28
13.1	معالجة الغشاء الحيوي	29
14.1	أهداف الدراسة	30
2.	**الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل**	

1.2	المواد	32
1.1.2	الأجهزة والأدوات	32
2.1.2	التعقيم	32
3.1.2	الأوساط الزرعية	33
1.3.1.2	وسط الغراء المغذي	33
2.3.1.2	وسط غراء الدم	33
3.3.1.2	وسط غراء الجكليت	33
4.3.1.2	وسط غراء الماكونكي	33
5.3.1.2	وسط غراء المانيتول الملحي	33
6.3.1.2	وسط غراء شكيلا- سالمونيلا	33
7.3.1.2	وسط نقيع القلب والدماغ السائل	33
8.3.1.2	وسط المرق المغذي السائل	33
9.3.1.2	وسط غراء سيمون ستريت	33
10.3.1.2	وسط غراء كلغلر والحديد	33
11.3.1.2	وسط غراء اليوريا	33
12.3.1.2	وسط مرق المالونيت السائل	34
13.3.1.2	وسط ماء الببتون	34
14.3.1.2	وسط احمر المثيل والفوكس بروسكور السائل	34
15.3.1.2	وسط الفنيل الانين	34
16.3.1.2	وسط فالكو لإزالة مجموعة الكاربوكسيل السائل	34
17.3.1.2	وسط الأكسدة والتخمر	35
18.3.1.2	وسط تخمر السكريات	35
19.3.1.2	وسط الحركة	36
20.3.1.2	وسط الإدامة	36
4.1.2	المحاليل والصبغات والكواشف	36
1.4.1.2	المحلول الملحي الفسيولوجي	36
2.4.1.2	محاليل صبغة كرام	36
3.4.1.2	كاشف الكاتليز	36
4.4.1.2	كاشف الإنزيم المؤكسد	37
5.4.1.2	كاشف كوفاكس	37
6.4.1.2	كاشف احمر المثيل	37
7.4.1.2	كاشف الفوكس بروسكور	37
8.4.1.2	كاشف كلوريد الحديديك	38
2.2	طرائق العمل	38
1.2.2	النمذجة	38
1.1.2.2	عزل الجراثيم الملوثة للحليب البقري الخام	38
2.1.2.2	دراسة ميكانيكية تكون الأغشية الحيوية في حاويات الحليب	38
2.2.2	تداول العينات	40
1.2.2.2	الزرع المختبري	40
2.2.2.2	حساب الوحدات المكونة للمستعمرات	41
3.2.2.2	التشخيص	41

1.3.2.2.2	الخصائص المظهرية والزرعية	41
2.3.2.2.2	الاختبارات الكيموحيوية	41
4.2.2.2	إدامة المزارع البكتيرية	44
5.2.2.2	التحليل الإحصائي	45
3.	**الفصل الثالث: النتائج والمناقشة**	
1.3	العزل والتشخيص	46
2.3	تحديد العزلات البكتيرية الملوثة للحليب البقري الخام	46
1.2.3	العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام	50
2.2.3	العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام	53
3.3	التعداد البكتيري الكلي الحي	55
1.3.3	تأثير التغاير الفصلي في التعداد البكتيري الكلي	57
2.3.3	تأثير التعداد البكتيري الكلي في قيم الرقم الهدروجيني	58
4.3	دراسة استمرارية نمو وتكاثر البكتريا وتكون الغشاء الحيوي	60
1.4.3	علاقة التعداد الابتدائي للبكتريا مع أعدادها خلال مدة الخزن وتأثيرها في قيم الرقم الهدروجيني	60
2.4.3	أنواع وأعداد البكتريا المكونة للغشاء الحيوي في حاويات الحليب	62
5.3	الفحص المجهري	69
6.3	ميكانيكية تكون الأغشية الحيوية	72
	الاستنتاجات والتوصيات	82
	المصادر العربية	83
	المصادر الاجنبية	84

قائمة الاختصارات

الاختصار	المفردة الاصطلاحية	المعنى
TPC	Total plate count	العدد البكتيري الكلي الحي
EPS	Exopolysubstances	مواد متعددة خارجية
CSLM	Confocal scanning laser microscope	مجهر متعدد البؤر ليزري ماسح
SPC	Standard plate count	العد القياسي بالاطباق
ANOVA	Analysis of variance	تحليل التباين
r	Relation factor	عامل الارتباط
CPC	Coliform plate count	عد بكتريا القولون
SPC	Staphylococci plate count	عد بكتريا المكورات العنقودية
LSD	Least significant deference	اقل فرق معنوي

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	مراحل تكون الغشاء الحيوي عن Zottola (2001)	20
2	العوامل المؤثرة في عملية تكون الغشاء الحيوي عن Wimpenny (2000)	22
3	مخطط يوضح طرائق العمل	40

4	النسبة المئوية للعزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام المعزولة من عينات الحليب البقري الخام	50
5	النسبة المئوية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام المعزولة من عينات الحليب البقري الخام	52
6	النسبة المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من عينات الحليب البقري الخام	54
7	العلاقة بين قيم pH والتعداد البكتيري الكلي المحسوب في الاشهر الحارة	59
8	العلاقة بين قيم pH والتعداد البكتيري الكلي المحسوب في الاشهر الباردة	59
9	تغير معدل الاعداد البكتيرية اللوغارتيمية الموجودة في الحليب مع مدة الخزن	61
10	تغير معدل الرقم الهيدروجيني للحليب مع مدة الخزن	61
11	النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة و الموجبة لصبغة كرام و المتحركة و غير المتحركة المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب	63
12	النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب	65
13	النسب المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب	66
14	مراحل تكون الغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية	71-70
15	النسب المئوية للعزلات البكتيرية الملتصقة على الشرائح الزجاجية المغمورة في حاويات الحليب لكل عينة	77-75
16	النسب المئوية للعزلات البكتيرية المعزولة من الشرائح الزجاجية	78
17	النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة و الموجبة لصبغة كرام و البكتريا المتحركة و غير المتحركة المعزولة من الشرائح الزجاجية	80
18	منحنى نمو الخلايا البكتيرية الملتصقة على الشرائح الزجاجية المغمورة في حاويات الحليب	81

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت على العزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من الحليب الخام	47
2	الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت على العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام العائدة للعائلة المعوية المعزولة من الحليب الخام	48
3	الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت على العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام غير المعوية المعزولة من الحليب الخام	49
4	التعداد البكتيري الكلي (TPC) و تعداد البكتريا المعوية (CPC) وبكتريا *Staphylococcus* (SPC) في الاشهر الحارة و الباردة	56
5	تأثير التغاير الفصلي في التعداد البكتيري الكلي (TPC) و تعداد البكتريا المعوية (CPC) وبكتريا *Staphylococcus* (SPC)	58
6	تقدير تكون الاغشية الحيوية على جدار حاويات الحليب بطريقة المسحة الجدارية	68
7	تتابعية التصاق العزلات البكتيرية على الشرائح الزجاجية المغمورة في	74-73

	حاويات الحليب بحسب مدة الخزن	

الملاحق

رقم الملحق	العنوان
1	تحليل التباين لتأثيرمدة الخزن في ازدياد اعداد البكتريا المكونة للغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية