

**الباب الرابع**  
**التحليل الميكروبيولوجي**



## الفصل الأول

### مواد العلف

يؤدي الفحص الميكروبيولوجي لمواد العلف للوقوف على مدى سلامتها وصلاحتها للعلف من عدمه ، وإذا ما كانت تسبب في الإضرار بصحة الحيوانات المغذاة على مثل هذه المواد . وقد ترى النماوات الفطرية في بعض الحبوب الفردية ، فتعد الحبوب المنبتة وتفحص الجذور والنباتات ، ثم تفرد الحبوب في طبق بتري معقم على ورق ترشيح مرطب ، ثم تغطى بورق ترشيح مبلل في الغطاء كذلك ( ولا يسمح بزيادة استخدام الماء والإيعاق الإنبات ) . يحفظ الطبق على حرارة الغرفة ( حوالي ٢٠ م ) ، ويفحص الطبق يوميا أو كل يومين ، وتفحص بالنسبة للرائحة وظهور فطريات العفن وكذا بناء إنباتات وجذور . فإذا أنبتت ٩٠-١٠٠٪ من الحبوب بهذه المعاملة دون عفن تكون العينات ذات جودة عالية ، وإذا لم ينبت عدد كبير من الحبوب فإن الجودة عادة تكون سيئة نتيجة حصاها رطبة أو تخزينها طويلاً قبل التجفيف ، ففي هذه الظروف تنبت في أكياسها وبالتجفيف تتحطم الإنباتات .

الحبوب التالفة ( كالحنطة والشعير المخزون ) تعد من الخطورة بمكان على صحة الحيوانات ، لارتفاع محتواها من الفطر والبكتريا ، فالعدوى الثانوية ببكتريا كلوستريديوم برفرنجنس *Clostridium perfringens* من النوع (D) تؤدي إلى حالات وفاة فجأة .

ولإجراء الفحص الكامل ميكروبيولوجيا يحتاج ذلك إلى متخصصين في الميكروبيولوجي ، أو إلى متخصص بكتيريا ، ومتخصص فطريات ، وهكذا لإجراء الميكروتكنيك الخاص الذي يؤدي للتعرف على العد الميكروبي ، والتصنيف الميكروبي للأجناس والأنواع لتحديد كم ونوع الكائنات المرضية ، وإذا ما كانت قادرة على إنتاج سمومها من عدمه . وفي ذلك يستعمل المتخصص كثير من الأدوات والأجهزة التي منها : الشرائح الزجاجية بأنواعها وأغطيتها وعلبها ، أحواض صبغ ، مخابير ، ماصات ، جواهر كشافة ، أقلام شمع ورصاص وجبرشيني ، أجهزة تعقيم ، مسطحات تسخين ، موقد كحولي ، مجاهير ، ... إلخ .

ولا تلعب البكتريا وسمومها دوراً كبيراً في التلف الميكروبي لمواد العلف كما تلعب الفطريات . وليكون الفحص البكتيري لمواد العلف ذا جدوى فينبغي مراعاة التعرف على أجناسها بجانب العد الكلي . إذ أنه ليست كل الكائنات الحية الدقيقة ضارة بل إن أنواعاً

وأشكالاً معينة منها فقط هي الضارة. فنجد أن بالشوفان يصل العدد البكتيري أعلى من ١٠ مليون/ جرام عقب الحصاد وهو رقم طبيعي إلا أن معظمه من البكتيريا الخاصة بالحبوب وغير الضارة وتسمى بالبكتيريا الصفراء من عائلة Achromobacteriaceae . إلا أن تكوين الفلورا الثانوية (Bacilles, Micrococces, Clostridium, Enterobacteriaceae, Pseudomonaden) تؤدي إلى الفساد . وعموماً فإنه من الطبيعي أن نجد حتى ١-٥ مليون بكتيريا وحتى ١٠٠,٠٠٠ وحدة بانية للمستعمرات الفطرية في كل جرام علف وذلك في مختلف أنواع الحبوب .

وعموماً فإن النتيجة الموجبة للكشف عن السموم له أهميته الكبرى عن الكشف عن البكتيريا ، إذ أن الفلورا تتعرض للعديد من التأثيرات المستمرة . ( موت البكتيريا - السيلجة - التكعيب - التعقيم ) وعليه فقد لا يمكن إعادة الكشف عن العدد الميكروبي ، أو قد لا تتوافر ظروف بناء التوكسينات ( حرارة - مادة العلف - نسبة ك أ / أ ) . وعليه فإن النتيجة الموجبة للكشف عن التوكسين تعطي مؤشراً لتواجد ظروف إنتاج توكسينات أخرى كذلك ونظراً لصعوبة تحديد الحدود المسموح بها لعدد البكتيريا في مواد العلف فإن النقاش يدور حديثاً فقط حول مشكلة السالمونيلا . وفيما يلي جدولاً بالعد الميكروبي للأعلاف التالفة وغير التالفة :

عدد ميكروبي عالي جداً لعلف تالف		عدد ميكروبي عالي لعلف أقل طزاجة		عدد ميكروبي طبيعي لعلف طازج		مادة العلف
فطر ألف/جم	بكتيريا مليون/جم	فطر ألف/جم	بكتيريا مليون/جم	فطر ألف/جم	بكتيريا مليون/جم	
٤٠ <	٤ <	٤٠-١٠	٤-١	١٠ >	١ >	مساحيق دم أو لحم أو عظم
٥٠ <	٥ <	٥٠-٢٠	٥-٢	٢٠ >	٢ >	مسحوق سمك
٢٠٠ <	١٠ <	٢٠٠-٨٠	١٠-٦	٨٠ >	٦ >	رجيع وحبوب (عدا الذرة)
١٠٠ <	٨ <	١٠٠-٥٠	٨-٤	٥٠ >	٤ >	ذرة
٨٠ <	٦ <	٨٠-٤٠	٦-٣	٤٠ >	٣ >	مخلفات مطاحن
١٠٠ <	٤ <	١٠٠-٥٠	٤-٢	٥٠ >	٢ >	مخلفات معاصر
٨٠ <	٤ <	٨٠-٢٠	٤-١	٢٠ >	١ >	كسب صويا

والجدول السابق يوضح القيم الإرشادية للحكم على مادة علف ما من حيث صفاتها الصحية الميكروبيولوجية ، أو التلف الحادث لها طبقاً للعد الميكروبي ( فطر ، بكتيريا ) .

وقد قدر المدّ الميكروبي بطرق مختلفة ( سواء بطحن المادة العلفية أو تطريتها أو بإضافة أجار لمعلق الجراثيم ) لعدد من مواد العلف التجارية ولخصت كالتالي :

المدد الميكروبي		مادة العلف
بكتيريا مليون / جم	فطر / جم	
١,٣٠ - ٠,٠٢	٥٧٥٠٠ - ١٠٠	علف ماشية حلابة
٠,٢٠	٥٥٠ - ٤٠٠	علف عجول
٣,٥٠ - ٠,٢٠	٨٤٠٠٠ - ٣٣٠٠	علف دجاج بياض
١١,٠٠	١٠٧٠٠ - ٨٥٠٠	علف كناكيت هادئ
٠,١٥ - ٠,٠٨	١٠٠٠ - ٠٧٥٠	علف كناكيت بدارى
٤٠,٠٠ - ٠,٥٠	١٠٠٠٠ - ٣٦٠٠	علف كناكيت تسمين
٢,٠٠ - ٠,٤٠	٣٥٠٠٠٠ - ١٠٠	علف خنازير تسمين
٨,٠٠ - ٢,٠٠	٣٠٠٠٠٠٠ - ١٩٠٠٠٠	كسب قطن مكعبات
٠,٠٤ - ٠,٠١	٥٠٠	مركزات بروتين
٠,٧٠ - ٠,٤٠	٥٠٠	فول صويا مطحون
٠,٢٠ - ٠,١٠	١٢٥٠ - ١٦٠	ذرة مطحونة
٠,٥٠ - ٠,١٠	١١٢٠٠ - ١١٠٠٠	نخالة قمح
٠,٠٦ - ٠,٠٥	١٠٠٠٠ - ٨٢٥٠	محرق سمك

وتتميز مواد العلف التالفة بفعل الميكروبات بنمو بكتيريا معينة وتراكم النواتج الميتابوليزمية للبكتيريا والفطر ، وعدد البكتيريا لا يغير بمفرده طزاجة مادة العلف ، أو يحكم على تلفها بل من المهم كذلك التعرف على أنواع البكتيريا والفطريات السائدة في مادة العلف . ومن الممكن تقسيم مادة العلف إلى ثلاث درجات من التلف تسود في كل منها بعض الكائنات الحية الدقيقة المميزة لكل درجة تلف ، ومن الأهمية التعرف عليها إذ أن تراكمها في مادة علف يعطي خلفية عما يمكن تواجده من سمومها التي قد تؤذي الحيوان بالتغذية عليها .

وأهم هذه السموم هي السموم الفطرية Mycotoxins بسبب تأثيراتها الدموية Haematic أو الكلوية Nephritic أو الكبدية Hepatic أو الجلدية Dermatic أو العصبية Neurotic السامة وكذلك لنشاطها السرطاني Carcinogenic والتشويهي Teratogenic أو الاستروجيني-Oestrogen

.ic

ودرجات التلف الثلاثة لمادة علف تزيد فيها العدّ الميكروبي تدريجياً من أول درجة إلى ثالث درجة تلف، حتى لا نجد الكائنات الحية عناصر غذائية في مادة العلف فيبدأ العدّ الميكروبي يتناقص بعد أن وصل إلى درجة تشبع لا يستطيع الزيادة عددياً بعد ذلك بل لا يستطيع التمثيل الغذائي فيموت جزء كبير منها ، أو تتأثر بإنزيمات خلاياها فيقل العدّ الميكروبي عن ثاني درجة تلف للعلف، وهذا دليل على تمام التلف . وتظهر رائحة الأمونيا وكبريتيد الهيدروجين نتيجة معدنة المادة العضوية ، وهنا يكون التلف الميكروبي لمادة العلف ليس من الصعب ملاحظته بالعين المجردة .

ورغم ارتفاع العدّ الميكروبي في الحبوب عن الأعلاف حيوانية الأصل إلا أن هجوم الكائنات الحية الدقيقة للحبوب أقل عن هجومها للأعلاف ذات الأصل الحيواني لحماية الأولى بجدر الثمرة أو الحبة ، وهو ما لا يتوفر في المنتجات الحيوانية نتيجة تصنيع مادة جسم الحيوان بالماكينات ، علاوة على سهولة مهاجمة البروتين الحيواني ( نتيجة دنترته Denaturation جزئياً ( إنزيمياً )) من قبل الميكروبات .

**الأعلاف النباتية السليمة أو مخالطها الغنية بالحبوب تحتوي Achromobacteriaceen ،** وطالما أن العدّ الميكروبي في حدود مليون / جم فليس لها قيمة ، كما أن الفطريات تكون أقل من ١٠٠٠ جرثومة / جم ، وهي من أنواع مختلفة علاوة على وجود الخمائر . أما الأعلاف النباتية ذات أول درجة من التلف فإنها تحتوي على بكتريا رمية كالكوكس والباسيللس، والعدّ الميكروبي لا يتعدى عدة ملايين / جم ، وعندما تنتشر الفطريات على الأخص الاسبرجيللس ( من مجاميع كانديدس أو جلاوكس ) فهذا دليل لبداية التلف ، والعدّ الفطري يقع ما بين ١٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠٠٠ جرثومة / جم ، ولا توجد الخمائر في هذه الحالة باستثناء في السيلاج ونابت الشعير . ثاني درجة من التلف تتميز بسيادة الكوكس الرمي والبزيدوموناداسيا والباسيللس كالكوليستيريدا بأعداد أكبر من ١٠ مليون/جم، مع عد فطري أعلى من مائة ألف جرثومة Spores لكل جرام علف معظمها اسبرجيللس وبنسيليوم وإذا زاد العدّ الفطري عن مليون / جم فإن العلف لا يصلح للتغذية ويبدو عليه التلف ماكروسكوبياً بوضوح .

**أما الأعلاف ذات الأصل الحيواني فتختلف كائناتها الحية لفقر الأعلاف هذه في الكربوهيدرات عن الأعلاف النباتية ، لكن في الأعلاف الحيوانية المصابة بالدرجة الأولى من التلف تنتشر بها الكوكس الرمي والباسيللس بشدة كذلك استربتوكوكس بكثرة مع ضالة الفطريات . أما في ثاني درجة من التلف فتنتشر بها نفس الأنواع المثيلة في الأعلاف النباتية ويصل عدّها لدى الملايين من البكتيريا .**

ومن البكتريا البانية للسموم في مواد العلف مايلي :

وجودها	البكتريا
أعلاف كالسيلاج، بديلات اللبن، رقائق البنجر، السمك، الروث. اللبن ومنتجاته . أعلاف رطبة غنية بالبروتين .	Clostridium botulinum Staphylococcus aureus Bacillus cereus

بينما من البكتيريا الموجودة في مواد العلف والتي تكون سمومها في الحيوان وليس في العلف ما يلي :

وجودها	البكتريا
كل مواد العلف الممكنة خاصة الحيواني منها . كل مواد العلف . مواد العلف الرطبة الغنية بالبروتين . سيلاج .	Salmonella Escherichia coli (Pathogenic) Clostridium perfringens Listerien

### الفطريات والخمائر والبكتيريا :

نتيجة القذارة وسوء التخزين تتلوث مواد العلف بمواد حيوية خارجية كالفطريات والخمائر والبكتيريا مما يجعل مواد العلف غير مقبولة أو ضارة . بنمو الفطريات تتحطم أنسجة مواد العلف لتكوين العفن . ويصاحب هذه النموات تلفاً لمادة العلف في مواصفاتها الطبيعية ( الميكانيكية واللون والرائحة والطعم ) والكيميائية ( زيادة رمادها وانخفاض محتوياتها من المواد العضوية وتخليق نواتج سامة ) .

ويجرى فحص هذه الكائنات باستخدام ميكروسكوب وشريحة عد ( تشبه شريحة عد كرات الدم Haemocytometer ) بعمل مستخلص مائي لعينة العلف وتخفيفه إلى حجم معلوم ويؤخذ منه قطرة على الشريحة وتغطي بغطاء شريحة وتفحص تحت الميكروسكوب في ضوء النهار للتعرف على أنواع هذه الكائنات وعدد كل منها .

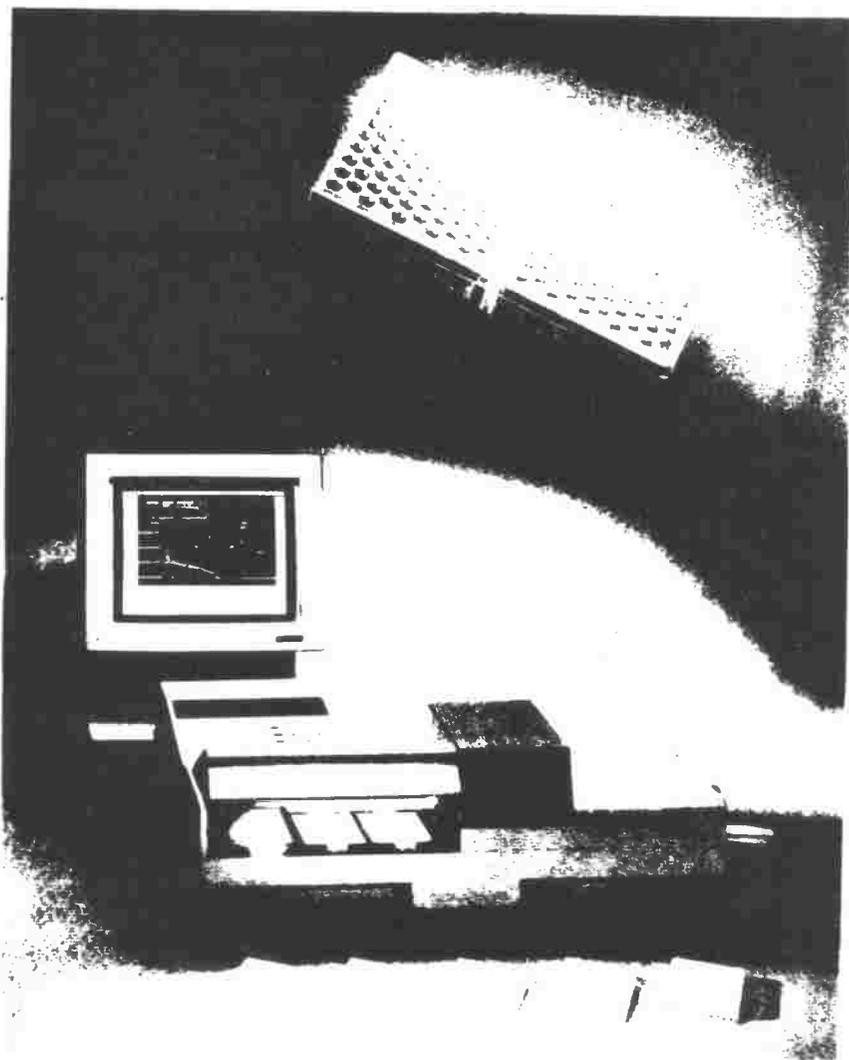
وقد يجرى اختبار حيوي للفطريات باستخدام طريقة فلورسنت ( فلورسين دي اسيتات - ائيديم بروميد ) حيث تظهر الخلايا الفطرية الحية فلوروكروماتين ، أي تراكم خلوي من الفلورسين ، والذي يظهر بلون أخضر تحت ميكروسكوب ذي أشعة فوق بنفسجية ، بينما الخلايا الميتة تظهر لوناً أحمر فاتحاً والذي يرجع لدخول ائيديم بروميد . فهناك ارتباط جيد بين هذا الاختبار وطريقة عد المستعمرات الفطرية ، علاوة على أن هذا الاختبار سريع

وحساس جداً وبسيط .

وإذا كان الفحص الميكروسكوبي يفيد في عد الجراثيم الحية للفطريات فإن تتبع الدلائل الكيماوية ( كالكيتين في جدر خلايا الفطريات ، ارجوستيرين ( أكثر الاستيرينات تواجداً في الفطريات ) C يساعد كثيراً في تقدير كتلة الفطريات ( النمو الفطري ) في مواد العلف . وتستخدم الطرق التحليلية الحديثة ( كجهاز تحليل الأحماض الأمينية ) المبنية على تقدير الكيتين ( بوليمر للجلوكون أمين ) وذلك للكشف عن الفطريات غير الحية في الأغذية والتي قد تكون أنتجت سمومها قبل موتها .

وهناك جهاز تحليل للميكروبيولوجي Microbiology Analyzer يمكن من رسم منحنيات نمو لأي كائن حي دقيق مع قياس العكارة الناتجة من نموه وبنج عمل عام في أسبوع واحد .

ويستخدم اختبار Limulus للكشف السريع عن جودة الأعلاف واللحوم ومنتجاتها ميكروبيولوجيا ، لتقدير البكتريا السالبة لصبغة جرام ( ومعظمها انتيرو باكتيريا ويزيدومونادا) كعد كلي للخلايا الحية والميتة وذلك في ظرف حوالي ٩٠ دقيقة . ويعتمد هذا الاختبار على التفاعل بين التوكسين الداخلي ( ليبوبولي سكاريد LPS ) كمكون في الجدار الخلوي الخارجي للبكتيريا السالبة للجرام ، وذلك مع ليسان خلايا الأمية ( خلايا الدم ) من Limulus Polyphemus على رقائق تقدير الاندوتوكسين بالمعايرة والتي تحدد المحتوى من الإندوتوكسين والذي بدوره يرتبط بعدد البكتيريا السالبة للجرام . وهذا الاختبار واحد من الاختبارات السريعة للعد البكتيري المتوفرة.. في الأسواق حالياً في صورة Kits سابقة التحضير وسهلة وسريعة الأداء .



## Microbiology Analyzer

(شكل ٣٥) جهاز تحليل للميكروبيولوجي

فلتقدير جودة الحبوب أصبح من العسير الكشف عما بها من سموم فطرية عديدة ، أو عد فطرياتها التي قد تكون ماتت بأي معاملة حرارية أو غيره ، لذلك يقدر معدل إصابتها بالفطريات عن طريق تقدير أحد نواتج الفطريات كدليل كيميائي وهو الإرجسترون .

فيتم تصبين العينات مع قلوي تحت مكشف عاكس لوجود جزء من الإرجسترون في شكل استر في خلية الفطر ، ثم تستخلص العينة التي تم تصبينها باستخدام الهكسان العادي بالرج ، وجمع المستخلصات الهكسانية وتبخيرها على ٤٠ م تحت جو من النيتروجين ، ثم تنقل المتبقيات في كمية معلومة مناسبة من الميثانول أو الهكسان العادي أو البنزين أو كلوريد ميثيلين / إيزوبروبانول .

وقد ينقى المستخلص على عمود من السليكاجيل أو رقائق كروماتوجرافي ، ثم يقدر الإرجسترون على سبكتروفوتومتر على طول موجة ٢٨٢ نانومتر ، أو يفصل ويقدر على كروماتوجرافي سائل عالي الضغط على نفس طول الموجة باستخدام عمود (C-8) وغسيله بالميثانول / ماء (٥/٩٥) بمعدل ١,٥ مل / دقيقة فيظهر منحنى الإرجسترون بعد ٢,٤ دقيقة . ودقة الكشف ٠,١ جزء / مليون ويمكن اكتشاف ٨٤-١٠٢٪ من محتوى الإرجسترون بهذه الطرق . كما يمكن استخدام عمود من السليكاجيل ( ليكروسورب ) وغسيله بالهكسان العادي / كحول إيزوأميل (٥/٩٥) بمعدل ٢,٠ مل / دقيقة فيظهر الإرجسترون على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط بعد ٣,٦ دقيقة .

ولمزيد الايضاح يرجع إلى :

- Calich , V. L. G. et al . ( 1978) Mycopathogia , 66 : 175 .
- Dickens, J. W. & Welty, R. E. (1975) J. Aocs, 52 : 448 .
- Marsh, P. B. et al . ( 1969 ) J. Agr. Food Chem., 17 : 462 & 468.
- Meyer , H. et a . ( 1980 ) Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tiernahrung, 5. Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover.
- Muller, H. M. & Schwadorf, K. (1990) Anim .Res. Develop., 31: 71.
- Thalmann, A. & Moller, J. M. ( 1973) Die Bodenkultur, 24 : 402 .