الباب الرابع
التحليل الميكروبيولوچى

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصل الأول

مـواد العلـف

يؤدي الفحص الميكروبيولوچي لمواد العلف للوقوف على مدى سلامتها وصلاحيتها للعلف من عدمه ، وإذا ما كانت تتسبب في الإضرار بصحة الحيوانات المغذاة على مثل هذه المواد . وقد ترى النموات الفطرية في بعض الحبوب الفردية ، فتعد الحبوب المنبتة وتفحص الجذور والإنباتات ، 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 ٢٠م) ، 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 حصادها 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 ميكروبيولوچيا يحتاج ذلك إلى متخصصين في الميكروبيولوچي، أو إلى متخصص بكتيريا ، ومتخصص فطريات ، وهكذا لإجراء الميكروتكنيك الخاص الذي يؤدي للتعرف على العدّ 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 وحبرشيني ، 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

وأشكالا 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 لعديد من التأثيرات المستمرة . (موت البكتيريا ـ السيلجة ـ التكعيب ـ التعقيم) وعليه فقد لا يمكن إعادة الكشف عن العدد الميكروبي ، أو قد لا تتوافر ظروف بناء التوكسينات (حرارة ـ مادة العلف ـ نسبة ك أ٢ / أ٢) . 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 بالعدّ الميكروبي للأعلاف التالفة وغير التالفة :

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

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 قُدر العدّ الميكروبي بطرق مختلفة (سواء بطحن المادة العلفية أو تطريتها أو بإضافة آجار لمعلق الجراثيم) لعديد من مواد العلف التجارية ولخصت كالتالي :

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

وتميز 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 هى 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 تدريجيا من أول درجة إلى ثالث درجة تلف، حتى لا تجد الكائنات الحية عناصر غذائية في مادة العلف فيبدأ العدّ الميكروبي يتناقص بعد أن وصل إلى درجة تشبع لا يستطيع الزيادة عدديا بعد ذلك بل لا تستطيع 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 الهيدروچين 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 جزئيا (إنزيمياً)) من قبل الميكروبات .

الأعلاف النباتية السليمة أو مخاليطها 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 ١٠٠٠٠٠ جرثومة / جم ، ولا توجد الخمائر في هذه الحالة باستثناء في السيلاج ونابت الشعير . ثاني درجة من التلف تتميز بسيادة الكوكس الرمي والبزيدوموناداسيا والباسيللس كالكوليستريديا 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 ماكروسكوبيا 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 والباسيلليس بشدة كذلك استربتوكوكس بكثرة مع ضآلة الفطريات . أما في ثاني درجة من التلف فتنتشر بها نفس الأنواع المثيلة في الأعلاف النباتية ويصل عدّها لمدى الملايين من البكتيريا .

ومن البكتريا البانية للسموم في مواد العلف مايلي :

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

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

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

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) والكيماوية (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 ـ اثيديم بروميد) حيث تظهر الخلايا الفطرية الحية فلوروكروماسين ، 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 اثيديم بروميد . فهناك ارتباط جيد بين هذا الاختبار وطريقة عد المستعمرات الفطرية ، علاوة على أن هذا الاختبار سريع

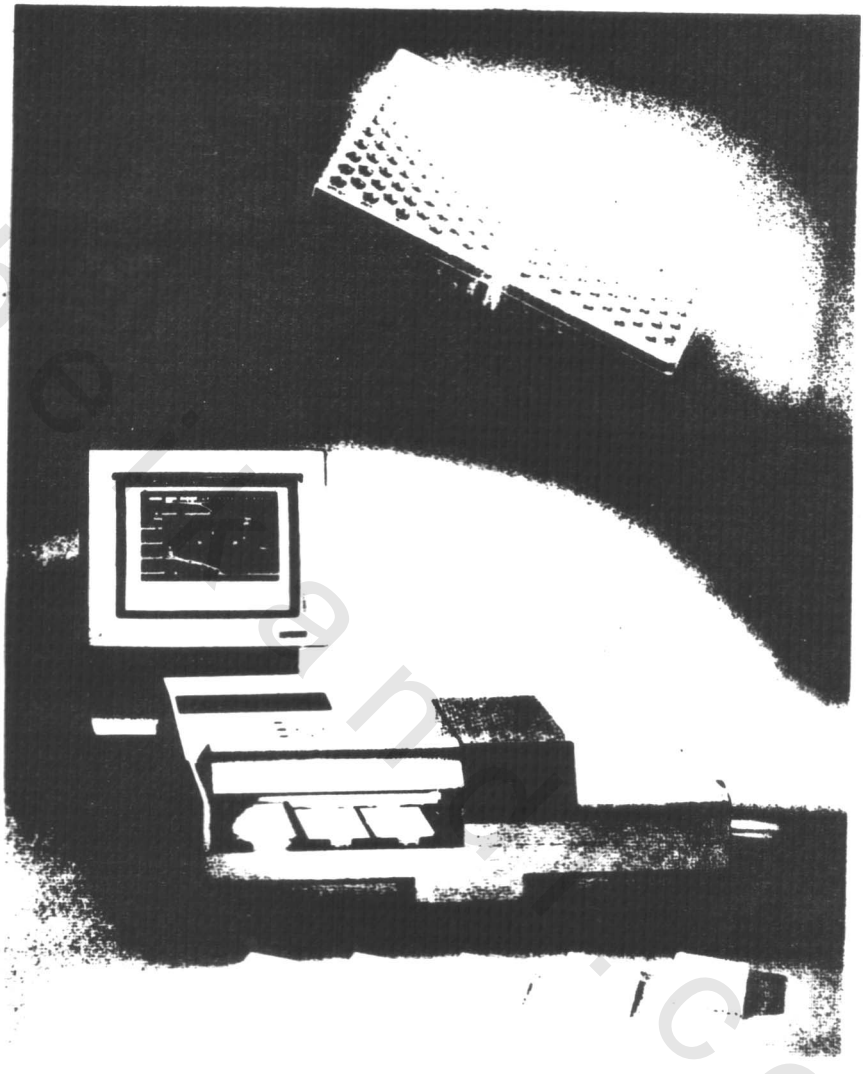
وحساس جداً وبسيط .

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 للجلوكوز 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 لأى كائن حي دقيق مع قياس العكارة الناتجة من نموه وينجز عمل عام في أسبوع واحد .

ويستخدم اختبار Limulus للكشف السريع عن جودة الأعلاف واللحوم ومنتجاتها ميكروبيولوجيا ، لتقدير البكتريا السالبة لصبغة جرام (ومعظمها انتيرو باكتيريا وبزيدوموناداا) 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 ليسات خلايا الأمبية (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 حاليا في صورة Kits سابقة التحضير وسهلة وسريعة الأداء .



Microbiology Analyzer

(شكل ٣٥) جهاز تحليل للميكروبيولوچي

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 كيماوي وهو الإرجسترول .

فيتم تصبين العينات مع قلوي تحت مكثف عاكس لوجود جزء من الإرجسترول 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 / ايزوبروبانول .

وقد ينقى المستخلص على عمود من السليكاچيل أو رقائق كروماتوجرافي ، ثم يقدر الإرجسترول 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 الإرجسترول بعد ٢,٤ دقيقة . ودقة الكشف ٠,١ جزء / مليون ويمكن اكتشاف ٨٤-١٠٢٪ من محتوى الإرجسترول بهذه الطرق . كما يمكن استخدام عمود من السليكاچيل (ليكروسورب) وغسيله بالهكسان العادي / كحول إيزواميل (٥/٩٥) بمعدل ٢,٠ مل / دقيقة فيظهر الإرجسترول 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 Ubungen in der Tiernahrung, 5. Auflage, Sprungmann Verllag, Hannover.
- Muller, H. M. & Schwadorf, K. (1990) Anim .Res. Develop., 31: 71.
- Thalmann, A. & Moller, J. M. (1973) Die Bodenkultur, 24 : 402 .