

## عزل وتشخيص الخمائر الملوثة لحليب الجاموس الخام

عبد الباسط عبد الصمد  
كلية الطب /جامعة واسط

علاوي لعبيبي داغر  
كلية الزراعة/جامعة القادسية

خيرري جميل وحيد  
كلية العلوم / جامعة واسط

### الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة أنواع الخمائر الملوثة للحليب الخام المجموع من الجاموس ودراسة قابليتها على إفراس أنزيمي البروتينيز واللايبيز، وكذلك دراسة كفاءة عملية البسترة في تحطيمها. جمعت العينات من قرية الذهب الأبيض في محافظة واسط خلال موسم الصيف (من بداية أيار 2010 إلى نهاية تموز 2010) فحصت خلالها 60 عينة في مختبر الأحياء المجهرية في كلية الطب جامعة واسط. وقد سجل ارتفاع معدل نسبة الإصابة بالخمائر في عينات حليب الجاموس الخام خلال موسم الصيف بنسبة 73% كما تم الحصول على 63 عزلة من الخمائر كذلك وشخصت ثمانية أنواع منها: *Rhodotorula spp.* 15.9%, *C.tropicalis* 19.1%, *Candida albican* 25.4%, *Crptococcus neoformans* 6.3%, *C.parapsilosis* 6.3%, *C.krusei* 9.5%, *Saccharomyces spp.* 14.3%, *C.famata* 3.2%, *C.Parapsilosis* 6.3% بينما لم تكن للخمائر المعزولة القابلة على إفراس إنزيم اللايبز ماعدا خميرة *Rhodotorula spp.*, *Crptococcus neoformans*, *Saccharomyces spp.* أظهرت النتائج أن عملية البسترة كانت لها كفاءة عالية جدا في القضاء على الخمائر، إذ إن جميع عينات الحليب الميبستر (20) كانت سالبة للعزل الخميري.

### المقدمة

فصل الصيف في محافظة واسط، جمع الحليب من أواني جمع الحليب في قرية الذهب الأبيض حيث مزج الحليب جيدا بعد ذلك جمع (250) مل من الحليب للعينة الواحدة بواسطة مغرفة (Dipper) معقمة، ووضع الحليب في حاويات معقمة و ثبت عليه رقم العينة ووقت وتاريخ ومكان أخذها ثم نقلت العينات الى المختبر تحت ظروف مبردة خلال ساعة واحدة.

#### 2- عزل الخمائر :

استعملت طريقة صب الأطباق (pour plate) لعزل الخمائر اذ يؤخذ 1 مل من الحليب الخام ويوضع في plant tube يحتوي على 9 مل من داريء الفوسفات الملحي (PBS) وبعد إجراء التخفيف العشرية على المحلول اخذ من كل تخفيف وزرع على طبقين من وسط السابرويد الدكستروز الصلب (SDA) وتحضن بدرجة 22 م لمدة 7 أيام (6).

#### 3- تشخيص الخمائر المعزولة : Identification of Isolated Yeasts

##### 1-3 الفحص العياني :

تم تشخيص الخمائر وفقاً لـ (25) بالاعتماد على الصفات الشكلية لمستعمرات الخمائر على وسط السابرويد الدكستروز الصلب (SDA) والمتضمن: الشكل واللون والحجم .

##### 2-3 الفحص المجهرى :

اجري اعتماداً على (25) باخذ قليل من الخميرة بواسطة ناقل معقوف (Transfer Loop) وضعت على وسط الشريحة الزجاجية بعد صبغها بصبغة الكرام او صبغة اللاكتوفينول الزرقاء وفحصت تحت المجهر بقوة (40X) لمشاهدة خلايا الخميرة وكذلك blastoconidia, pseudohyphae, chlamydospores والخيط الفطري الذي تكونه الخمائر تحت ظروف خاصة من التغذية.

3-3 نظام تشخيص الخمائر التجاري ( Api Candida ) :

يعد الحليب سائلاً بيولوجياً معقداً، وذلك لاحتوائه على البروتينات والدهون والفيتامينات والأملاح وكذلك الرطوبة العالية والحموضة المعتدلة فهو وسط جيد لنمو العديد من الكائنات المجهرية، ولصعوبة تجنب تلوثه بالكائنات المجهرية، فقد أصبح المحتوى الجرثومي هو ميزة مهمة في تحديد نوعية الحليب (30). وعليه فان مصادر تلوث الحليب الخام تكون مختلفة مثل الهواء وأدوات الحلب و الأعلاف و براز الحيوانات والحشائش (5). لان الحليب الخام يمكن ان يحتوي على بكتريا مرضية مثل *Listeria*, *Salmonella* O157: H7, *E.coli* إضافة للخمائر والاعفان حيث تحدث أمراض تهدد حياة المستهلكين (10). تعد الخمائر من الأحياء المجهرية التي تسبب مشاكل اقتصادية نتيجة مقاومتها لدرجة حرارة الانجماد وقابليتها على تغيير نوعية الحليب بإحداث رائحة وطعم غير مقبولين بسبب تحلل البروتين والدهن مما يسمح لنمو بعض أنواع الجراثيم المرضية كمضاعفات ثانوية (16). فضلاً عن المشاكل الصحية اذ تسبب حالات التسمم الغذائي والسرطانات نتيجة إفراس السموم الفطرية فيها مثل Aflatoxins (5). تعتبر عملية البسترة من الطرائق الفعالة في قتل الكائنات المجهرية الملوثة للحليب الخام ومن ضمنها الخمائر والاعفان، وعلى الرغم من مرور أكثر من قرن على اكتشافها فقد ثبت أنها الوسيلة الوحيدة لضمان سلامة الحليب ومنتجاته في جميع أنحاء العالم، إذ أوصت منظمة الغذاء والدواء (FDA) ومركز السيطرة على الأمراض (CDC) بشرب الحليب الميبستر فقط، لذا أجري هذا البحث للتعرف على أنواع الخمائر الملوثة لحليب الجاموس الخام كذلك التعرف على دور عملية البسترة في التخلص من هذه الملوثات.

#### المواد وطرائق العمل *Materials & Methods*

##### 1- جمع العينات :

جمعت 60 عينة من حليب الجاموس الخام للمدة من بداية أيار إلى نهاية تموز 2010 بحيث شملت

(27) حيث لقحت الأطباق بعد غرس ( طعن ) مقدار قليل من مستعمرة الخمائر في منتصف الطبق، وحصنت الأطباق المزروعة بدرجة 28 م لمدة 7 يوم، الخمائر المحللة للبروتين تظهر هالة شفافة ( Clear Zone) حول المستعمرات النامية.

5- معرفة تأثير البسترة على عدد الخمائر بالحليب الخام :

وقد اجري اعتماداً على (29) اذ وضعت عينات الحليب في انابيب اختبار (plan tube) سعة 10 مل ثم وضعت في الحمام المائي بدرجة حرارة 72 م لمدة 30 ثانية ، ثم بردت العينات مباشرة الى درجة 4 م بوضعها في الماء البارد ثم فحصت العينات لمعرفة وجود الاعفان في العينات بعد عملية البسترة.

هو نظام خاص بتشخيص الخمائر يعمل على تشخيص الخميرة بمدة 18-24 ساعة وهو من الطرق التشخيصية السريعة والمعتمدة في فحص الخمائر ويتم قراءة النتائج بعد مقارنتها بجداول خاصة

4- الكشف عن الخمائر المحللة لدهن وبروتين الحليب: تم الكشف عن الخمائر المحللة لدهن الحليب باستخدام وسط تريبوتيرين Tributyrin Agar وذلك حسب ما ذكره (18) حيث لقحت الأطباق بعد غرس ( طعن ) مقدار قليل من مستعمرة الخمائر في منتصف الطبق , حصنت الاطباق المزروعة بدرجة 30م لمدة 3 يوم، الخمائر المحللة للدهن تظهر هالة شفافة Clear (Zone) حول المستعمرات النامية.، بينما تم الكشف عن الخمائر المحللة لبروتين الحليب باستخدام وسط حليب الفرز skim milk agar حسب ما ذكره

### النتائج

*Rhodotorula* ، بنسبة 19.1 % ،  
*Saccharomyces spp.* ، بنسبة 15.9 % ،  
بنسبة 14.3 % ، *C.krusei* بنسبة 9.5 % ثم  
*Crptococcus neoformans* و *C.parapsilosis*  
بنسبة متساوية 6.3 % وسجلت *C.famata* بنسبة 3.2 %.

أولاً :أنواع الخمائر في حليب الجاموس كانت نسبة تلوث حليب الجاموس الخام بالخمائر خلال موسم الصيف 73 % ، إذ تم عزل الخمائر 43 عينة من أصل 60 عينة ، كما تم تشخيص 8 نوعاً من الخمائر و كما موضح في الجدول (1) ومعظم العينات أظهرت إصابة مشتركة بأكثر من نوع خميرة واحد، إذ كانت أعلاها نسبة *C.albicans* بنسبة 25.4 %،

الجدول (1) عدد عزلات ونسب الإصابة بالخمائر في عينات حليب الجاموس الخام

الخميرة	عدد العزلات	%
<i>C.albicans</i>	16	25.4
<i>C.tropicalis</i>	12	19.1
<i>Rhodotorula spp.</i>	10	15.9
<i>Saccharomyces spp.</i>	9	14.3
<i>C.krusei</i>	6	9.5
<i>C.parapsilosis</i>	4	6.3
<i>Crptococcus neoformans</i>	4	6.3
<i>C.famata</i>	2	3.2
المجموع Total	63	100

الجدول (2) يبين نتائج فحوصات Api Candida للخمائر المعزولة

Test	<i>Saccharomyces</i>	<i>C.Tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.Krusei</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.famata</i>	<i>Crptococcus neoformans</i>
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	-	+	+	-
Trehalose	-	+	-	-	+	+	-
Raffinoswe	+	-	-	-	-	-	-
Beta – Maltosidase	-	+	-	-	-	-	-
Alfa – A mylase	-	+	-	-	-	-	+
Beta- Xylosidase	-	-	-	-	-	-	+
Beta- Glucuronidase	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	+
N- Acetyl –Beta- Glucosaminidase	-	-	-	-	+	-	+
Beta- Galactosidase	-	-	-	-	-	+	-

على إفراز إنزيم اللاييز ( تحليل الدهن ) ما عدا خميرة  
, *Saccharomyces spp.*, *Rhodotorula spp.*  
*Crptococcus neoformans*.

ثانياً: الخمائر المحللة لدهن وبروتين الحليب :  
من الجدول (3) يتبين ان جميع الخمائر المعزولة من  
عينات حليب الجاموس كانت لها القابلية على إفراز  
إنزيم البروتيز (تحليل البروتين) ما عدا  
*C.parapsilosis*، كما أظهرت الخمائر عدم قابليتها

الجدول (3) قابلية عزلات الخمائر المعزولة من عينات حليب الجاموس على إفراز إنزيمي البروتيز واللاييز

نوع الخميرة	تحليل البروتين	تحليل الدهن
<i>C.albicans</i>	+	-
<i>C.tropicalis</i>	+	-
<i>Rhodotorula spp.</i>	+	+
<i>Saccharomyces spp.</i>	+	+
<i>C.krusei</i>	+	-
<i>C.parapsilosis</i>	-	-
<i>Crptococcus neoformans</i>	+	+
<i>C.famata</i>	+	-

جداً فجميع العينات الـ 20 المبسترة كانت سالبة لعزل  
الخمائر.

ثالثاً: معاملات الحليب الحرارية  
البسترة :

يبين الجدول (4) أن كفاءة عملية البسترة ( HTST )  
72 م لمدة 30 ثانية في تحطيم الخمائر كانت عالية

الجدول (4) كفاءة عملية البسترة في تحطيم الخمائر

المعاملة الحرارية	عدد العينات	الموجبة	السالبة
البسترة	20	0	20

### المناقشة

اولاً: أنواع الخمائر الملوثة لحليب الجاموس الخام

إن عزل الخمائر بنسبة عالية 73 % من حليب الجاموس الخام ، يعود ذلك إلى تعرض الحليب الخام إلى العديد من الملوثات الخارجية التي يكون مصدرها الحيوانات و الهواء وأدوات الحلب والأعلاف والحشائش وهذا يتفق مع ما توصل إليه (2 و 6 و 19). وقد تم عزل خميرة *C.albicans* بنسبة كبيرة (25.4 % من حليب الجاموس الخام، حيث يرجع سبب ذلك إلى إعطاء الحيوانات كميات كبيرة من المضادات الحيوية التي تسبب اختزال فيتامين A مما يقود إلى جرح الطبقة الطلائية للضرع مما يسهل الإصابة بهذه الخميرة هذا ما أكدته (19) وتتفق هذا النتائج مع (4) الذي عزل الخميرة من الحليب الخام البقري بنسبة 25% كذلك تتفق مع (21). كما عزلت خميرة *C.tropicalis* بنسبة 19.1 ويعود سبب ذلك إلى إصابة الجاموس كذلك جمعت منه عينات مصابة بالتهاب الضرع، كما أكد (28) بأن خميرة *C.tropicalis* تعد من احد مسببات التهاب الضرع في الأبقار والجاموس. وتتفق هذا النتائج مع

(21) الذي عزل الخميرة من حليب جاموس مصابة بالتهاب الضرع وكذلك مع (32). وان عزل خميرة *Rhodotorula spp.* بنسبة 15.9 % ، يعكس الانتشار الواسع للخميرة في الطبيعة إذ تنتشر في المياه والهواء والتربة والحليب ومنتجاته (17). ويتفق هذا مع ما توصل إليه (24) الذي عزل الخميرة من حليب الجاموس و (34) الذي عزل الخميرة من حليب الأبقار. أما بالنسبة لعزل خميرة *Saccharomyces spp.* فكانت نسبة توأجدها 14.3 % ، إذ أن تواجد الخميرة بهذه النسبة يعكس قابلية الخميرة على التواجد في الحليب الخام وهذا يتفق مع ما توصل إليه (14) إلى أن أكثر أجناس الخمائر تواجداً في الحليب الخام هي (*Candida* , *Saccharomyces* , *Rodurotella*). وكذلك تتفق مع ما توصل إليه (35) الذي وجد أن الخميرة تنمو في درجات حرارة لا تتعدى (28 - 32) م كحد أدنى وهي ما تسود نوعاً ما في فصل الصيف. فيما يتعلق بخميرة *C.krusei* عزلة بنسبة 9.5 % من الحليب يعود ذلك إلى انتشارها الواسع في الطبيعة حيث تعد احد الممرضات الانتهازية وان استعمال طرائق الفحص الحديثة أدى دوراً مهماً في الكشف عنها ، إذ إنها تصيب الجهاز التناسلي وتكون عادة من دون اعراض مرضية *Symptomless* لذا فوجود أي عامل يقلل مناعة الحيوان يؤدي إلى حدوث الإصابة بهذه الخميرة (12). أما بالنسبة لخميرة *C.parapsilosis* فقد وجدت بنسبة قليلة بلغت 6.3 % في عينات الحليب وكذلك الحال بالنسبة لخميرة

ثانياً : القابلية على إفراز البروتياز واللايباز ان جميع الخمائر المعزولة كانت لها القابلية أيضاً على إفراز أنزيم البروتياز (تحليل بروتين) ما عدا خميرة *C.parapsilosis*. وتتفق هذا النتائج مع (8 و 9 و 26 و 31 و 33) حيث وجدوا أن جميع أجناس خميرة *Candida* لها القابلية على افراز انزيم البروتياز (protase) الذي يعمل على تكسير بروتين الحليب إلى نتائج ايسط من احماض امينية وبيبتيدات وفي حالة احتواء واحد او اكثر من هذه البيبتيدات على حوامض امينية طرفية مرة يظهر الطعم المر في الحليب (22). كذلك كانت الخمائر المعزولة لها القابلية لفرز إنزيم اللايباز (Lipase) ماعدا خميرة *Candida* وأجناسها الخمسة وتتفق هذه النتائج مع ما وجدوه كل من (7 و 8) إذ اثبتوا أن خميرة *Rhodotorula spp.* , *Saccharomyces spp.* كانت لها القابلية على افراز انزيم اللايباز (Lipase) حيث ان لهذا الانزيم الأثر الفعال في احداث التحلل المائي للدهن مما يؤدي إلى ظهور النكهة المتزنخة المرفوضة في الحليب وبعض منتجاته والنتيجة من تحلل وتراكم الحوامض الدهنية في الحليب و هذه المنتجات، في حين تعد هذه النكهة مميزة ومرغوبة في البعض الآخر مثل بعض الاجبان التي ينتج منها حوامض دهنية حرة تتحول إلى مركبات النكهة الطيارة (13).

ثالثاً: معاملات الحليب الحرارية. أظهرت النتائج أن عملية البسترة من نوع (HTST) 72 °م لمدة 30 ثانية كانت ذا كفاءة عالية في القضاء على الخمائر . وتتفق هذه النتائج مع كل من (3 و 23) حيث تمكنا من القضاء التام على الخمائر التي كان معدلها  $15 \times 10^3$  وحدة مكونه للمستعمرة / مل في الحليب الخام باستخدامها عملية البسترة. ويعود ذلك إلى الخمائر من الإحياء المجهرية الحساسة بالحرارة حيث ان جميع الخمائر يمكن القضاء عليها بدرجة حرارة 60 °م وهي قريبة لدرجة حرارة البسترة (1 و 11).

### المصادر

2. العزاوي ، جنان خالد ( 2004 ). دراسة مرضية لاهم الفطريات المعزولة من الحليب ومنتجاته في بغداد . رسالة ماجستير / كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

1. الدليمي ، خالد صلاح . (1988). علم الاحياء المجهرية للاغذية . الجزء العملي الطبعة الثانية . جامعة بغداد / كلية الزراعة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

- Food Science and Technology. England
12. Frey, D.; Oldfield, R.J. and Bridger , R.C.(1985). Acolor Atlas of Pathogenic Fungi, Wolf Medical Puplication, London.
  13. Fox, P.F .; Oconnor, T.P.; McSweeney, P.L.H.; Guinee, T.P. and Obrier, N.M. (1998). Physical, Chemical, Biochemical and nutritional Aspect. Adv. Food Nut. Res., 39: 163-328.
  14. Ghodker, D.R.; Ronganthan,B. and Dudani, A.T. (1980). Yeasts & Moulds in indigenous milk products. India. J. of Dairy Sci., 33 (2): 255-259 .
  15. Gilbert, J. (2002) . Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. Trends in Analytical Chemistry, 21, 468-486.
  16. 16-Jacobsen, N. and Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. Int. Dairy J., 6: 755-768 .
  17. Kiehn, T.E.; Gorey, A.E.; Browen, F.F. and Armstrong, B. (1992). Sepsis due to *Rodotorulla* related to use indwelling central venous catheters. Clin. Infect. Dis., 14 :841-846 .
  18. Koburger, J.A. and Jacger, K.E. (1987). Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. Appl. Environ. Microbial., 53: 211.
  19. Krukowski, H.; Tretze, M.; Majewski, T. and Rozanski, P. (2001). Survey of yeast mastitis in dairy herds of small-type farmers In the Lublin region-Poland. Mycopathologia. 150 (1): 5-7.
  20. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (2000 ). The yeasts . A Taxonomic study . Elsevier Scientific B.V, Amsterdam, Netherlands
  21. Lagneau, P.E.; Lebtahi, K. and Swinne, D. (1996). Isolation of Yeast from bovine milk in
  - 3.AL-Tahiri, A. (2005). A Comparison on Microbial Conditions Between Traditional Dairy Products Sold in Karak and Same Products Produced by Modern Dairies. Pakistan Journal of Nutrition. 4: 345-348.
  - 4.Carrasco, M.S. (1988). Atoxic study of yeast strains from milk products. Revista dela faculted de Ingenierria. Quimica. Universidad Ncional del Litoral. Argentina . 4829-36.
  - 5.Coorevits, A.; De Jonghe,V.; Vandroemme, J.; Reekmans, R.; Heyrman, J.; Messens, W; DeVos, P. and Heyndrickx, M. (2008). Comparative analysis of the diversity of aerobic-spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional Driay farms. System. Appl. Microbiol. In press.
  - 6.Eck, A. and Gillis, J.C. (2001). Cheese making. 2<sup>nd</sup> Ed. Lavoisier Publishing. ISBN. UK.
  - 7.El-Diasty, E.M. (2004). Study on mycological quality of fish. Ph.D. Thesis, Fac. Vet. Med. Cairo Univ. Beni-Suef branch .
  - 8.El-Diasty, E.M. and Salem, R.M.(2007). Incidence of Lipolytic and Proteolytic Fungi in Some Milk Products and Their Public Health Significance. J. Appl. Sci. Res., 3(12): 1684-1688.
  - 9.El-Diasty, E.M. and Salem, R.M. (2009). Incidence of Lipolytic and Proteolytic Fungi in Some Milk Products and Their Public Health Significance . Arab J. Biotech. 12 (1): 49-56.
  10. FAO (2007). Food and Agricultural organization of the United Nation. Rome. Manuals of Food Quality Control. Microbiol. Anal. 4: 6.
  11. 11-Fellows, P. (2000). Food processing technology. Principles and practice. 2<sup>nd</sup> edition. Woodhead Publishing in

- microbiology. London. Philadelphia.
29. Renner, E. (1996). Nutritional aspects-Part I-Biochemical composition of pasteurized milk. Bulletin of the International Dairy Federation, 5: 27-29.
30. Rogelj, E. (2003). Microorganisms of importance in raw milk. Michigan Dairy Review, 8: 7-9.
31. Sayed, A.A.K.,( 1999). Proteolytic fungi in some meat products: Their incidence and methods for inhibition. M.V.Sc. Thesis, Fac. Of Vet. Med.,Assiut Univ., Egypt.
32. Santos R.C. and Marin J.M.(2005 ). Isolation of *Candida* spp. from mastitic bovine milk in Brazil. Mycopathologia. 159: 251-255.
33. Spanamberg, A.; Alves, S.H. and Valente, P. (2009). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. Acha scinentiae Veterinarian. 37: 133-141.
34. Spanamberg, A.; Wounder, E.A.; Pereira, D.I.P. and Ferreiro, L. (2008). Diversity of yeast from bovine Mastitis in Southern Brazil. Rev. Iberoam Micol. 25: 154-156 .
35. Walczycka, M.; Grega, T.; Sady, M. and Turotszy, M. (2009). the assessment of selected milk and meat products obtained in a traditional way. Biotechnology in Animal Husbandry. 25: 773-783.
- Belgium. Mycopathology. 135: 99-102.
22. Law, B. A. (1984). The accelerated ripening of chesses. In advance in microbiology and biochemistry of cheese and fermented. Elsevier applied Science publishers London and New York .
23. Lewis, M.J. (1994). Heat Treatment of Milk. In: Modern Dairy Technology, Vol.1 (Advances in Milk Processing) Ed. R.K. Robinson, Chapman and Hall.
24. Lore, T.A.; Mbugua, S.K. and Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of micro flora in suusac, a Kenyantraditional fermented camel milk product. Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 38 : 125–130.
25. Moris, D.V.; Melhem, M.S.; Martins, M. A.; and Mendes, R. (2008). Oral *Candida* spp., colonization in human immunodeficiency virus-infection individuals. J. Venom. Anim. Toxins. Inf. Trop. Dis., 14: 1678-1999.
26. Nasser, L.A., (2002). Mycological status of imported canned fish consumed in Saudia Arabia with special reference to proteolytic activity. Assiut .Vet. Med. J., 47: 125-130.
27. O'reilly, T. and Day, D.F. (1983). Effects of culture conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. Appl. Environ., 45: 1132.
28. Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K. and Carter, G.R. (1998). Clinical veterinary

