الدرس العملي الثالث عشر

الكشف عن البكتريا المتجرثمة في اللبن ومنتجاته

أهداف الدرس

- التعريف بالمشاكل التي تسببها البكتريا المتجرثمة في اللبن ومنتجاته.
- التعريف بأهمية الكشف عن وجود البكتريا المتجرثمة في الأغذية والألبان.
- الإلمام بالأساس العلمي لطريقة الكشف علي البكتريا المتجرثمة في اللبن ومنتجاته.
- التدريب العملي علي طريقة الكشف عن البكتريا المتجرثمة في عينات من اللبن ومنتجاته.
- التدريب العملي علي طريقة الكشف عن البكتريا المتجرثمة في عينات من اللبن ومنتجاته.

الأجهزة والأدوات

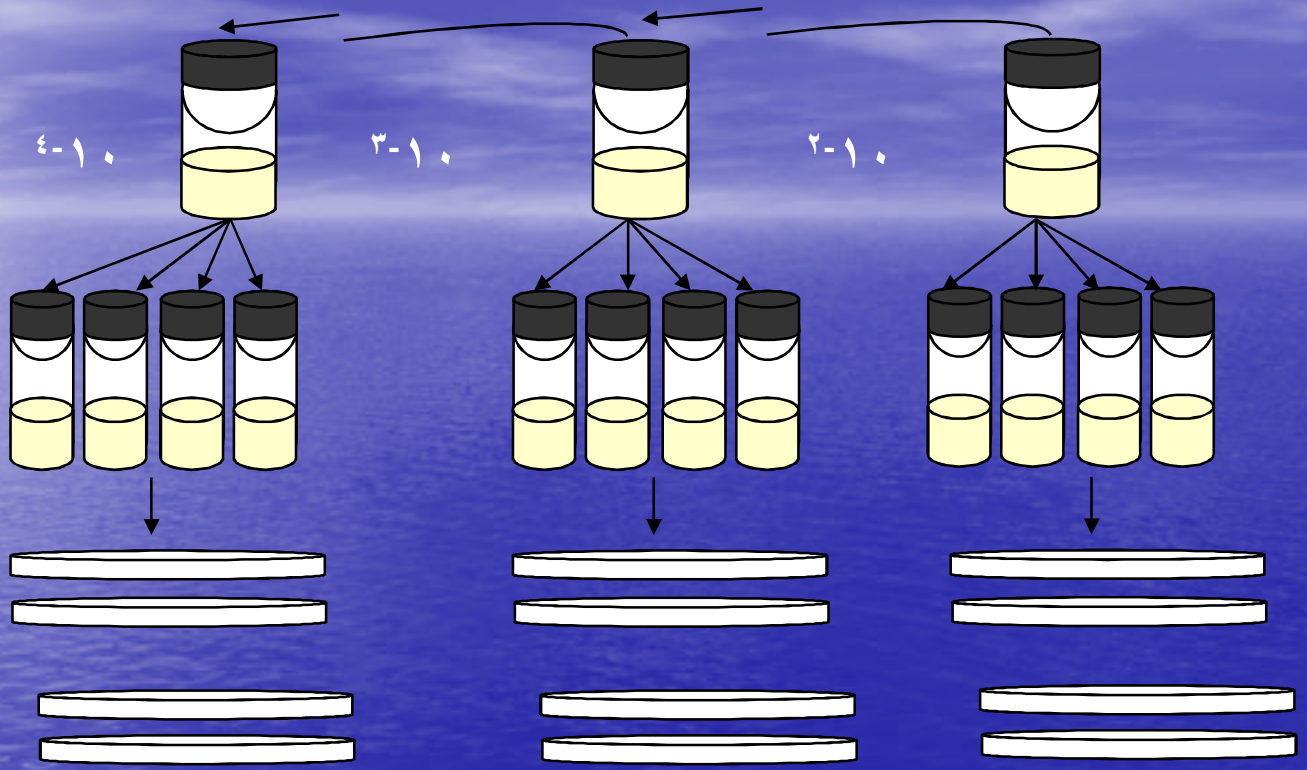
- حمام مائي مضبوط علي ٨٠°م.
- حمام مائي مضبوط علي ٥٠°م.
- حضان كهربائي.
- مجهر ضوئي.
- أواني تنمية لاهوائية (Anaerobic jars).
- أطباق بتري صغيرة معقمة.
- ماصات بلاستيكية معقمة ومعها ساحب بلاستيك.

المواد والمزارع البكتيرية

- عينة لبن خام وعينة جبن رأس.
- بيئة مستخلص التربتون والجلوكوز الصلبة (Tryptone glucose extract (TGE) agar) معقمة وموزعة بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار.
- بيئة الثيوجلايكولات الصلبة (Thioglycolate agar) معقمة ومعبأة في دورق مخروطي.
- مزرعة عمرها ٣ أيام من بكتريا *Bacillus subtilis* منماة علي بيئة الأجار المغذي (Nutrient agar).
- صبغة أخضر الملاكيت (Malachite green).
- صبغة السفرانين (Safranin).

الكشف عن وتقدير البكتريا المتجرثمة الهوائية واللاهوائية في عينات لبن وجبن رأس

- يتم تحضير عينات اللبن الخام والجبن الرأس وعمل تخفيفات عشرية منها وذلك كما فعلت في الدروس العملية السابقة.
- في كل عينة يتم اختيار التخفيف الثاني (٠.٠١) والثالث (٠.٠٠١) والرابع (٠.٠٠٠١) ونأخذ ١ مللي من كل تخفيف ويضاف إلي كل من أربعة أنابيب تحتوي علي ٩ مللي من بيئة مستخلص التربتون والجلوكوز الصلبة (Tryptone glucose extract (TGE) agar) والتي تم إسالتها وحفظها علي ٥٠°م (لاحظ يضاف ١ مللي تخفيف إلي كل أنبوبة)



الكشف عن وتقدير أعداد البكتريا المتجرثمة الهوائية واللاهوائية في الجبن الرأس واللبن الخام.

- توضع أنابيب TGE الملقحة مباشرة في حمام مائي تم ضبطه علي ٨٠°م وذلك لمدة ٣٠ دقيقة، وكما ذكرنا فإن الهدف من هذه الخطوة هو قتل البكتريا الخضرية في العينة والإبقاء علي الجراثيم، ولكن يجب مراعاة أن يتم التسخين الفوري لأنابيب TGE بعد تلقيحها بالعينات المخففة حيث أن التأخر في وضعها في الحمام المائي يساعد علي إنبات الجراثيم بالبيئة وتحولها إلي خلايا خضرية يكون من الممكن القضاء عليها بالتسخين وبالتالي لا يكون تقدير الجراثيم دقيقاً.
- بعد التسخين في الحمام المائي يتم نقل الأنابيب مباشرة إلي حمام مائي آخر سبق ضبطه علي ٥٥°م وتترك فيه لمدة ٥ دقائق حتى تبرد وتصبح مناسبة للصب في الأطباق.

- يتم صب محتوي كل أنبوبة في طبق بتري معقم وبذلك يكون لدينا ٤ أطباق بتري لكل تخفيف من العينة.
- تترك الأطباق لتتصلب ثم يوضع طبقين من كل تخفيف مقلوبين في الحضان علي درجة ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة، وخلال ذلك يحدث انبات للجراثيم وذلك بمساعدة الأحماض الأمينية والمركبات الأخري الغنية بالكربون والطاقة في بيئة TGE ثم يتم عد المستعمرات النامية ومنها يمكن حساب عدد البكتريا المتجرثمة الهوائية المحبة للحرارة المتوسطة بالعينة وذلك باستخدام المعادلة السابق الإشارة إليها في اختبار العد الكلي للبكتريا.

- يترك الطبقين الآخرين من كل تخفيف ليتصلبان أيضاً ثم يضاف ٤-٥ مللي من بيئة الثيوجلايكولات الصلبة (Thioglycolate agar) والتي تم إسالتها بحيث تكون طبقة علي سطح بيئة TGE، ويعمل مركب ثيوجلايكولات الصوديوم الموجود ببيئة الثيوجلايكولات علي الاتحاد بالأكسجين مما يساعد علي توفير ظروف لا هوائية، وبعد ذلك توضع الأطباق مقلوبة في إناء تنمية لا هوائية (Anaerobic jar) وتترك لمدة ٤٨ساعة علي ٣٥°م، ثم يتم عد المستعمرات ومنها يتم حساب عدد البكتريا المتجرثمة اللاهوائية المحبة للحرارة المتوسطة بالعينة.

صبغ البكتريا المتجرثمة

- يتم أخذ لمسه من المزرعة وفردها علي هيئة طبقة رقيقة علي شريحة زجاجية مع تثبيت هذه الطبقة باستخدام اللهب.
- تترك الشريحة لتبرد ثم تضاف صبغة أخضر الملاكيت وتترك لمدة ٥ دقائق.
- يتم غسيل الصبغة بالماء وتترك الشريحة لتجف.
- تضاف صبغة السفرانين الحمراء لمدة ١ دقيقة ثم يتم غسيلها وتترك لتجف.
- تفحص الشريحة باستخدام العدسة الزيتية وتلاحظ الجراثيم بلونها المخضر بينما تظهر الخلايا الخضرية باللون الأحمر.
- ارسم الخلايا كما تراها تحت المجهر