

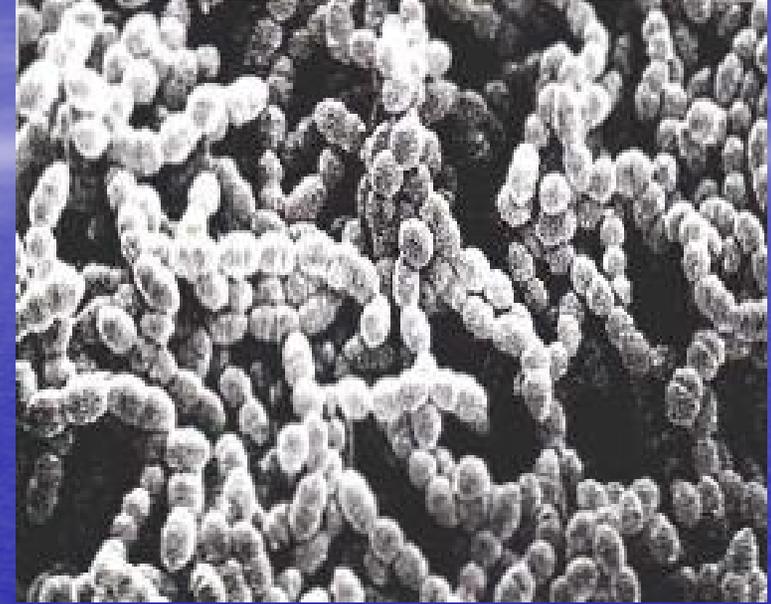
الدرس العملي الرابع

الكشف عن التلوث بالباكتريوفاج ودراسة
تأثيره علي بكتريا البادئ

مشكلة الباكتريوفاج في صناعة الألبان

q الباكتريوفاج (Bacteriophage) أو الفاج (Phage) هو أحد أنواع الفيروسات التي تهاجم البكتريا وتستخدم ما تحتويه من أحماض نووية وإنزيمات للتكاثر والزيادة في العدد مما يؤدي إلى تثبيط الأنشطة الحيوية للخلية البكتيرية وتحللها وانفجارها وذلك عند وصول الفاج إلى أعداد كبيرة

q عند تصنيع المنتجات اللبنية تحت ظروف صحية غير سليمة أو عند التنشيط المتكرر لبادئات بكتريا حامض اللاكتيك بدون مراعاة النظافة والتعقيم في الأدوات المستخدمة فإن هذه البكتريا تكون عرضة للإصابة بالفاج مما يسبب ضعف نشاطها وعدم قيامها بتخمير اللبن وتجنبه علي النحو المناسب مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية فادحة.



- علي اليمين صورة بالمجهر الالكتروني لميكروب *S. thermophilus* قبل الإصابة بالفاج
- علي اليسار صورة بالمجهر الالكتروني لنفس الميكروب بعد إصابته بالفاج وتحلل جزء كبير من خلاياه.

الأجهزة والأدوات

١. حضانات كهربية (Incubators).
٢. حمام مائي (Water bath) مضبوط علي ٤٦°م.
٣. شرايح زجاجية.
٤. إبر تلقيح (Inoculating loops).
٥. ماصات ميكرو لترية.
٦. أسنان ماصات (Tips) معقمة.
٧. كؤوس زجاجية (Beakers).
٨. ماصات حجمها ١٠ مللي ومعها ساحب بلاستيك.
٩. سحاحة مدرجة.
١٠. جفن صيني بيضاء.
١١. جهاز pH-meter .
٢١. مجهر ضوئي

المواد والمزارع الميكروبية

- لبن فرز مسترجع (١٠% مواد صلبة) معقم سبق توزيعه بمعدل ٢٠٠ مللي في دوارق مخروطية (Flasks) وتم تدفئته إلى ٤٢°م.
- محلول هيدوكسيد الصوديوم (٩/١ عياري).
- محلول دليل الفينولفيثالين.
- صبغة أزرق ميثالين.
- محلول كلوريد كالسيوم تركيزه ٠.٢ % معقم.
- بيئة soft agar (M17 + 0.5% glucose) النصف صلبة مسالة وموزعة بمعدل ٢.٥ مللي في أنابيب اختبار يتم حفظها علي حمام مائي علي درجة ٥٠°م لحين الاستخدام.
- بيئة (agar) (M17 + 0.5% glucose) الصلبة مصبوبة في أطباق بتري

- شرش جبن محتوي علي فاج متخصص لسلالة ميكروب
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* المذكور في النقطة ١٠ .
- شرش جبن محتوي علي فاج متخصص لسلالة ميكروب
- *S. thermophilus* المذكور في النقطة ١١ .
- مزرعة عمرها ١٨-٢٤ ساعة من ميكروب *Lc. lactis*
lactis.subsp منماة في بيئة broth السائلة عبارة عن
(M17 + 0.5% glucose)
- مزرعة ميكروبية عمرها ١٨-٢٤ ساعة تقريبا من ميكروب
S. thermophilus منماة في بيئة agar الصلبة
(M17 + 0.5% glucose)

الكشف عن وجود الفاج في شرش الجبن

- قم بتلقيح أنبوبة من بيئة soft agar المسالة بحجم قدره ١٠ µl من مزرعة *Lc. Lactis subsp. lactis* مع الرج برفق حتى لا تتكون فقاعات هوائية.
- قم بتلقيح أنبوبة أخرى من نفس البيئة بنفس المزرعة ثم أضف نقطة من شرش الجبن المحتوي علي الفاج المتخصص للمزرعة ثم نقطة من محلول كلوريد الكالسيوم المعقم مع المزج برفق
- صب محتويات الأنبوتين علي سطح طبقتين من بيئة + M17 (agar (0.5% glucose الصلبة (طبق لكل أنبوبة) ثم اتركها لتتصلب لمدة ٤٥-٦٠ دقيقة (لاحظ أن البيئة النصف صلبة يمكن أن تتصلب في وقت أقصر من ذلك ولكن يفضل تركها لهذه المدة حيث أن ذلك يعطي مناطق خالية من النمو أكثر وضوحاً وإنصلاً عن بعضها البعض) .

● توضع الأطباق مقلوبة في الحضان علي درجة حرارة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة.

● تفحص الأطباق بعدا لتحضين من حيث وجود المناطق الخالية من النمو

الكشف عن تأثير الفاج علي الشكل المورفولوجي وإنتاج الحموضة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك

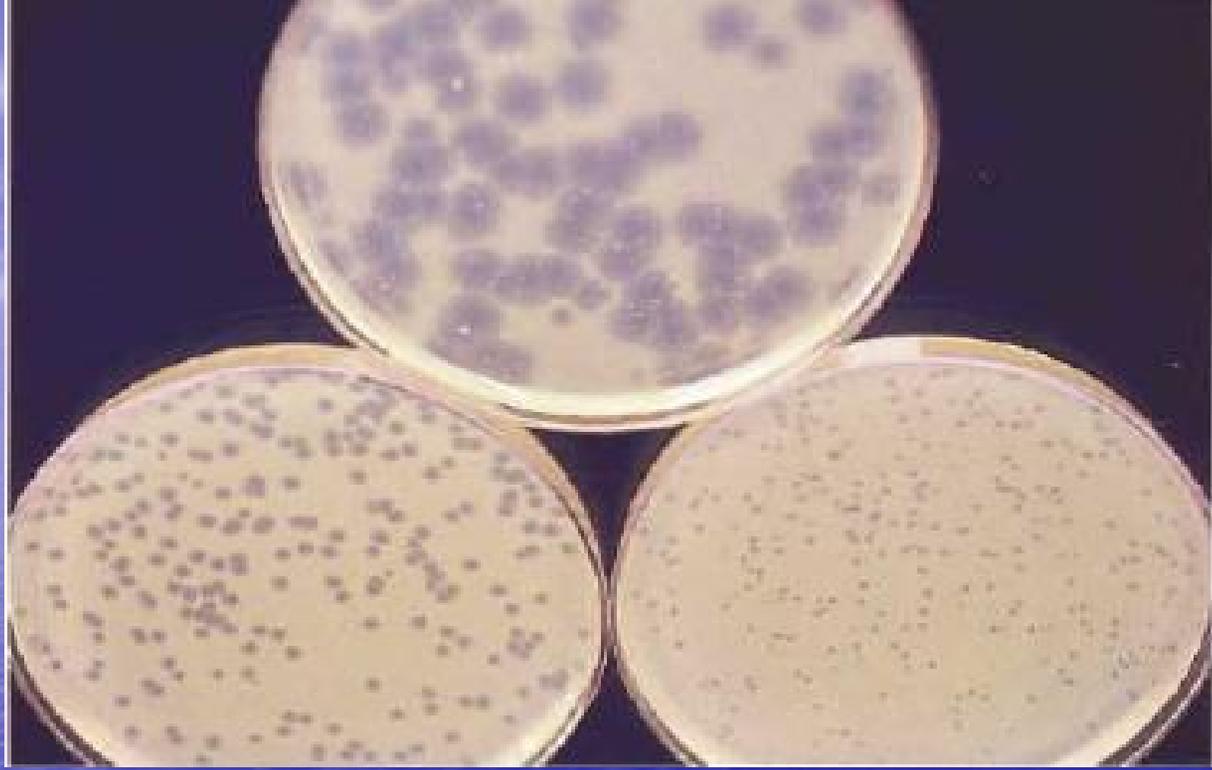
● قم بتلقيح ورق مخروطي يحتوي علي ٢٠٠ ملي لبن فرز مسترجع معقم بعدة مستعمرات من ميكروب *S. thermophilus* مع المزج الجيد.

● قم بتحضين الدورقين علي درجة حرارة ٤٢°م لمدة ٣ ساعات.

● يتم أخذ عينة (٢٠ ملي) من كل ورق كل ساعة لتقدير الحموضة ودرجة pH.

يتم أخذ لمسات من الدورقين كل ساعة وفحصه
وتسجيل المشاهدات في الجدول التالي

<i>S. thermophilus</i> + الشرش المحتوي علي الفاج			<i>S. thermophilus</i>			المزرعة
شكل الخلايا	pH	%ح	شكل الخلايا	pH	%ح	الوقت
						بعد التلقيح مباشرة بعد ساعة بعد ساعتين بعد ٣ ساعات



- تكون مناطق خالية من النمو (Plaques) نتيجة تحلل البكتريا بالفاج، لاحظ أن أقطار المناطق الخالية من النمو في الطبقة العلوية هي الأكبر يليها الطبقة الأيسر ثم الأيمن دورق آخر مع إضافة قطرة أو قطرتين من الشرش المحتوي علي الفاج المتخصص للميكروب