

الدرس العملي السادس

إنتاج المركبات المثبطة لنمو البكتيريا
(Bacteriocins) بواسطة بكتيريا حامض
اللاكتيك

أهداف الدرس

- التعرف بمركبات الباكترىوسين وفائدتها في حفظ الأغذية.
- الدراسة العملية لتأثير مركبات الباكترىوسين علي الميكروبات المرضية.
- الدراسة العملية لتأثير مركبات الباكترىوسين علي بكتريا حامض اللاكتيك.
- التدريب علي استخدام طريقة تقدير العكارة لتتبع نمو البكتريا.
- التدريب علي استخدام طريقة تقدير المناطق الخالية من النمو (Plaque assay) في دراسة التأثير التثبيطي لمركبات الباكترىوسين.

الأجهزة والأدوات

- حضانات كهربية (Incubators).
- جهاز سبكتروفوتوميتر (Spectrophotometer)
- ماصات ميكرولتريية.
- أسنان ماصات (Tips) معقمة.
- أنابيب إيبندورف (Eppendorff) مخروطية معقمة سعة ١.٥ مللي

المواد والمزارع الميكروبية

- نيسين تجاري (غالباً ما يباع تحت إسم ناسبلين Nasaplin).
- مزرعة من ميكروب *Staphylococcus aureus* عمرها ١٨-٢٤ ساعة ومنمأة في بيئة Brain Heart Infusion (BHI) السائلة.
- مزرعة من سلالة *Lb. leichmannii* ATCC 4797 عمرها ١٨-٢٤ ساعة ومنمأة في بيئة MRS broth السائلة.
- بيئة BHI السائلة موزعة بمعدل ١٠ في أنابيب اختبار.
- بيئة BHI السائلة موزعة بمعدل ١٠ في أنابيب اختبار وتحتوي علي التركيزات التالية من النيسين ١٠٠، ٥٠، ٢٥، ١٢.٥، ٦.٢٥، ٣.١٣ وحدة دولية/ملي (IU/ml). (س: ما هو تعريف الوحدة الدولية من النيسين؟).

- بيئة MRS soft agar النصف صلبة (تحتوي علي نفس مكونات بيئة MRS agar باستثناء احتوائها علي نصف كمية الأجار أجار في تلك البيئة) وموزعة بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار.
- محلول ملحي معقم تركيزه ٠.٨٥% موزع في بمعدل 50 µl في أنابيب إيبندورف المخروطية.

q أثير النيسين علي نشاط أحد الميكروبات المرضية

يتلخص الاختبار فيما يلي

- قم بتلقيح أنبوبة محتوية علي ١٠ مللي من بيئة BHI السائلة بحجم قدره ١٠٠ µl من مزرعة *Staphylococcus aureus* عمرها ١٨-٢٤ ساعة.

● قم بتكرار الخطوة السابقة مع أنابيب أخرى من بيئة BHI تحتوي على تركيزات مختلفة من النيسين ١٠٠، ٥٠، ٢٥، ١٢.٥، ٦.٢٥، ٣.١٣ وحدة دولية/ملي (IU/ml)

● قم بتحضير كل أنابيب BHI السابقة على درجة ٣٥°م لمدة ٣ ساعات مع أخذ عينة (١ ملي) كل نصف ساعة من كل أنبوبة لقياس الكثافة الضوئية (Optical Density (OD)) أو العكارة للبيئة والتي تدل على نمو الميكروب ويتم ذلك كما يلي:

● يتم ضبط جهاز الاسبكتروفوتوميتر Spectrophotometer على طول موجي قدره ٦٠٠ نانو ميتر (٦٠٠ nm) ثم توضع عينة من بيئة BHI الغير ملقحة بالميكروب أو النيسين في أنبوبة القياس بالجهاز والمعروفة باسم كيوفيت (cuvette) ثم يتم ضبط قراءة الجهاز لتصبح صفر

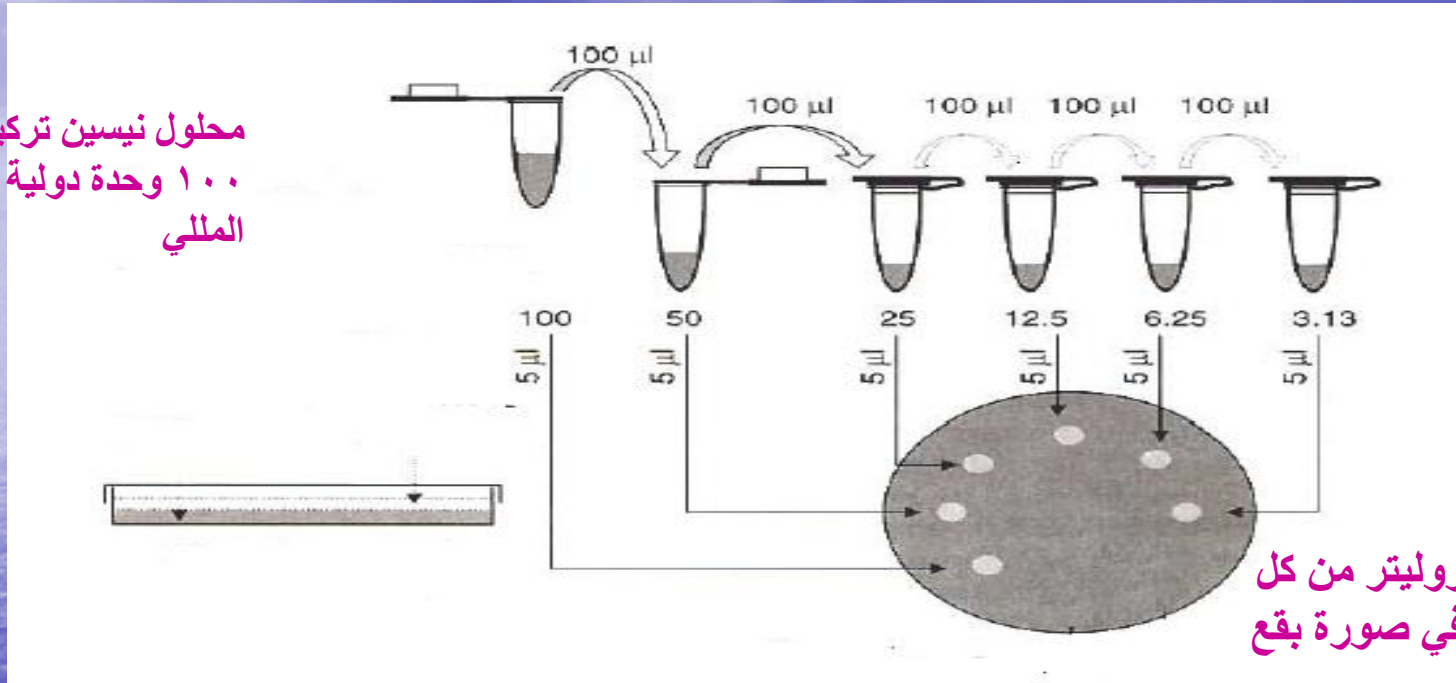
تأثير النيسين علي نشاط بكتريا حامض اللاكتيك

- قم بتحضير محلول يحتوي علي ١٠٠ وحدة دولية في الملي (١٠٠ IU/ml) من النيسين التجاري مسترشداً بالبيانات الموجودة علي عبوة النيسين والتي تدلك علي الكمية التي يجب إذابتها من مسحوق النيسين للحصول علي هذا التركيز، وتتم الإذابة في محلول ملحي معقم تركيزه ٠.٨٥% (يطلق عليه (saline) بحيث يكون الحجم الكلي ١٠٠ μ l ومن هذا الحجم قم بأخذ ٥٠ μ l وامزجها بنفس الحجم من محلول saline بحيث يتم تخفيف التركيز إلي ٥٠ IU/ml ثم كرر نفس الشئ مع التخفيف الجديد بحيث يتم عمل سلسلة من التخفيفات الثنائية القوة (Twofold dilutions) ويكون لدينا في النهاية التركيزات التالية ١٠٠، ٥٠، ٢٥، ١٢.٥، ٦.٢٥، ٣.١٣ IU/ml

أنظر الشكل التالي

إجراء تخفيفات ثنائية القوة للحصول علي
تركيزات النيسين المختلفة MRS الصلبة

محلول نيسين تركيزه
١٠٠ وحدة دولية في
الملي



((Spots

- تحضير التركيزات المختلفة من النيسين التجاري وتوزيعها علي
هيئة بقع علي سطح البيئة النصف صلبة السابق تلقيحها بميكروب
Lb. leichmannii

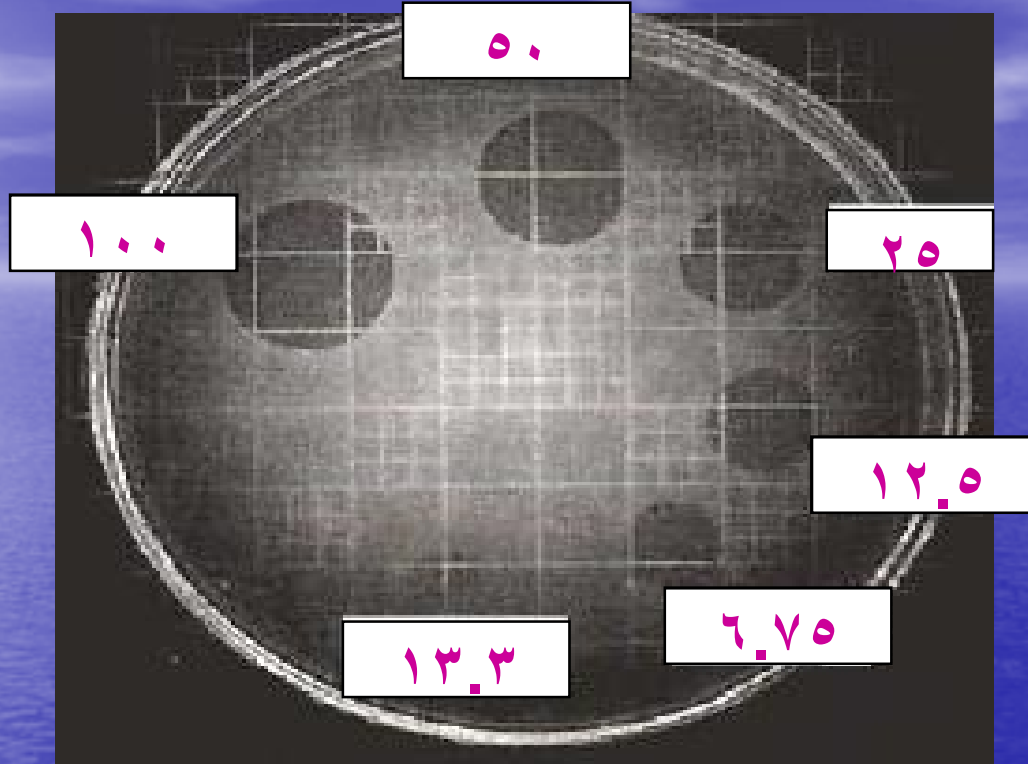
● انقل ١٠ µl من مزرعة *Lb. leichmannii* ATCC 4797 إلى أنبوبة محتوية علي ٩ مللي من بيئة MRS النصف صلبة والتي تم إسالتها والاحتفاظ بها في حمام مائي علي درجة ٥٠°م، ويتم مزج محتويات الأنبوبة برفق منعاً لتكون فقاعات هوائية.

● تصب محتويات الأنبوبة علي سطح بيئة MRS الصلبة

● (ب) ثم تترك للتصلب 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 وانفصالاً عن بعضها).

● قم بوضع ٥ µl من كل من تركيزات النيسين السابقة علي سطح البيئة، ويراعي أن يكون وضع الماصة المستخدمة عمودياً علي سطح البيئة بحيث تسقط الكمية من محلول النيسين في صورة بقعة (Spot) مستديرة بقدر المكان، كما يراعي أن تكون المسافات بين البقع علي سطح الأجار متساوية (انظر شكل ٧-ب)

● ترك الأطباق لفترة ٣٠-٦٠ دقيقة حتى يتم امتصاص البقع بواسطة البيئة ثم توضع الأطباق مقلوبة بالحضان علي درجة حرارة ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة



ظهور المناطق الخالية من النمو والتي يزداد قطرها مع
زيادة تركيز النيسين.

يتم فحص الأطباق من حيث وجود مناطق خالية من النمو مع قياس أقطارها وتسجيلها بالجدول التالي

قطر المنطقة الخالية من النمو	تركيز محلول النيسين
	100 IU/ml
	50 IU/ml
	25 IU/ml
	12.5 IU/ml
	6.25 IU/ml
	3.13 IU/ml