

الدرس العملي الحادي عشر

الكشف عن بكتريا القولون

Coliform group

في اللبن ومنتجاته

أهداف الدرس

- التعرف بيكتريا مجموعة القولون وأهمية الكشف عنها في اللبن ومنتجاته.
- التعرف بمفهوم المجموعات البكتيرية الدالة وكيفية الاستفادة منها.
- التعرف علي الأساس العلمي لطريقة الكشف عن بكتريا القولون في اللبن ومنتجاته.
- التدريب علي طريقة الكشف عن بكتريا مجموعة القولون في عينات من اللبن والجبن.

الأساس في طريقة الكشف عن بكتريا القولون في اللبن ومنتجاته

q تتضمن طريقة الكشف عن بكتريا القولون في الأغذية
واللبن ومنتجاته ثلاثة مراحل أو اختبارات وهي:

- الاختبار الاحتمالي Presumptive test
- الاختبار التحقيقي Confirmatory test
- الاختبار التكميلي Completed test

١- الاختبار الاحتمالي

- يستخدم هذا الاختبار في الكشف المبدئي عن وجود بكتريا القولون في العينات المختبرة وذلك اعتماداً علي قدرتها علي تخمير اللاكتوز وإنتاج غاز في بيئة سائلة مثل Lauryl sulfate tryptose (LST) broth أو صلبه مثل Violet red bile (VRB) agar، وفي حالة الحصول علي نتيجة سلبية أي عدم حدوث تخمر للاكتوز فإن هذا يدل علي خلو العينة المختبرة من بكتريا القولون أما إذا كانت النتيجة إيجابية فإن هذا يعطي احتمالاً بوجود بكتريا القولون بالعينة ويتم حجز الغذاء المختبر لحين إجراء الاختبار التأكيدي.

٢- الاختبار التأكدي

- يتم فيه التأكد من النتائج الايجابية المتحصل عليها في الاختبار الاحتمالي حيث يتم اختبار قدرة الميكروبات التي قامت بتخمير اللاكتوز في ذلك الاختبار علي القيام بتخميره في بيئة أكثر تخصصيه (أي أكثر تثبيطاً للبكتريا المنافسة) مثل بيئة Brilliant green lactose bile (BGLB) broth ومن خلال ذلك يمكن حساب تقدير تقريبي للعدد الكلي من بكتيريا القولون في عينات الأغذية المختبرة.

٤- الاختبار التكميلي

- تم هذا الاختبار بغرض التأكد من أن بكتريا القولون التي أعطت نتائج إيجابية في الاختبارين السابقين هي برازیه المصدر (Fecal coliforms)، وكذلك بغرض التأكد من أن ميكروب *E. coli* موجود كأحد مكونات تلك البكتريا بالعينات.
- ويتضمن الاختبار التكميلي فحص البكتريا التي أظهرت قدرة علي تخمير اللاكتوز في الاختبارين الاحتمالي و التأكيدي وذلك من حيث قدرتها علي تخمير اللاكتوز في بيئة (*E. coli*) (EC) broth السائلة وذلك علي درجة حرارة ٤٥.٥°م، وكذلك صفات المستعمرات التي تكونها علي بيئة Eosin methylene blue (EMB) agar الصلبة وتفاعلها مع صبغ جرام بالإضافة إلي إجراء مجموعة من أربعة اختبارات بيوكيميائية تسمى بمجموعة الايمفك

الأجهزة والأدوات

- حضان كهربائي.
- ماصات زجاجية معقمة ومعها صاحب بلاستيك.
- ماصات ميكرولتريية.
- أسنان ماصات ميكرولتريية (Tips) معقمة.

المواد

- عينة لبن الخام وعينة جبن دمياطي.
- بيئة Lauryl sulfate tryptose (LST) broth
السائلة معقمة وموزعة في أنابيب اختبار تحتوي على أنابيب درهام.
- بيئة Brilliant green lactose bile (BGLB) broth
السائلة معقمة وموزعة في أنابيب اختبار تحتوي على أنابيب درهام.
- محلول ملحي تركيزه ٠.٨٥% (saline) معقم وموزع بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار أو بيئة الاسترجاع الأقصى (Maximum recovery diluent) معقمة ومعبأة بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار.

الاختبار الاحتمالي للكشف عن بكتريا القولون في عينات من اللبن الخام والجبن الدمياطي

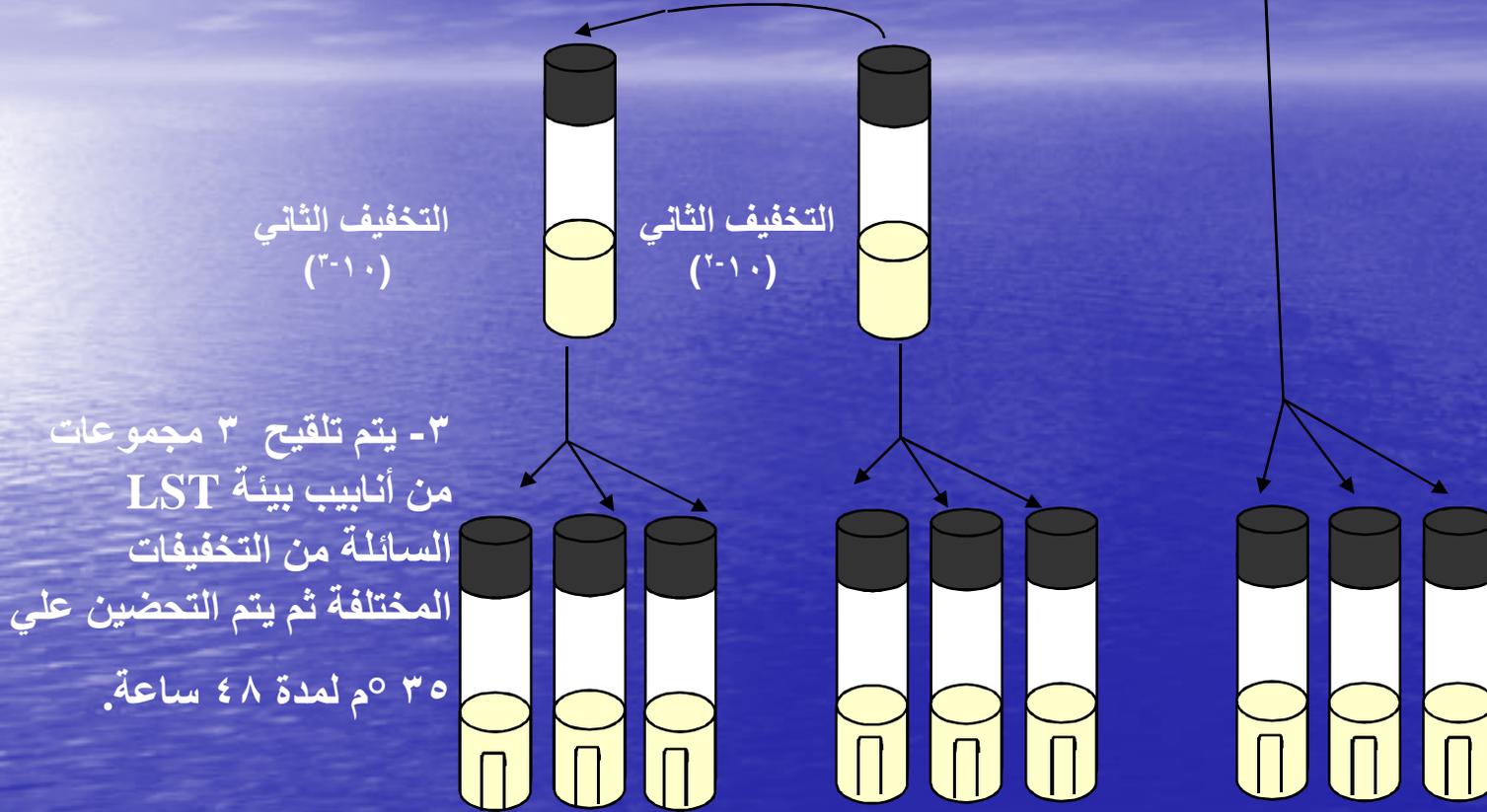
● قم بتحضير عينة اللبن الخام والجبن الدمياطي وعمل تخفيفات عشرية منها كما سبق أن فعلت في الدروس العملية السابقة.

● يتم اختيار تخفيفات مناسبة من العينة وتستخدم لتلقيح مجموعات من ٣ أو ٥ أنابيب تحتوي علي بيئة LST السائلة بواقع ١ مللي من العينة المخففة لكل أنبوبة في المجموعة ثم تحضن الأنابيب علي ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة \pm ٢ ساعة ثم تفحص لمعرفة تجمع الغاز في أنبوبة درهام (Durham's tube) التي توضع مقلوبة بداخل أنبوبة الاختبار المحتوية علي بيئة LST

١- إعداد عينة الجبن الدميائي أو اللبن الخام ومزجها بنسبة ٩:١ مع

محلول التخفيف فيمثل الناتج التخفيف الأول (١-١٠)

٢- يؤخذ ١ مللي من العينة لإجراء التخفيفات العشرية



خطوات الاختبار الاحتمالي للكشف عن بكتريا مجموعة القولون في اللبن الخام والجبن الدميائي.

- يتم تسجيل عدد الأنابيب التي أعطت نتيجة موجبة (أي التي تكون فيها غاز) وكذلك التخفيف الذي تم تلقيح الأنابيب منه حيث يتم استخدام هذه البيانات في حساب العدد التقريبي من بكتريا القولون في العينة وذلك بعد إجراء الاختبار التأكدي.
- ويمكن أن يتم تلقيح التخفيفات التي تم تحضيرها من العينة في أطباق من بيئة VRB الصلبة ثم يتم التحضين علي ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة مع عد المستعمرات الحمراء المزرقة والتي يتكون راسب حولها، ولكن غالباً ما يفضل استخدام بيئة سائلة في هذا الاختبار.

الاختبار التأكدي للكشف عن بكتريا القولون في عينات من اللبن الخام والجبن الدمياطي

- ترج أنابيب بيئة LST الموجبة في الاختبار الاحتمالي وذلك برفق ثم يؤخذ منها ملء عقدة إبرة التلقيح (Loopfull) وتنقل إلي أنابيب بيئة (BGLB) السائلة والتي تحضن علي ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة ثم يتم فحصها من حيث تكون الغاز بأنبوبة درهام الموجودة بها.
- يتم تسجيل الأنابيب الموجبة ومن خلال ذلك يتم التأكد من النتائج الموجبة السابق الحصول عليها في الاختبار الاحتمالي وحساب تقدير تقريبي لعدد بكتريا القولون في العينة بطريقة الرقم الأكثر احتمالاً وذلك كما سبق أن ذكرنا في الدرس العملي العاشر.