

الدرس العملي الثاني عشر  
تابع الكشف عن بكتريا القولون  
Coliform group  
في اللبن ومنتجاته

## أهداف الدرس

- التعرف بأهمية الكشف عن ميكروب *E. coli* عند الحصول علي نتائج موجبة في الاختبارين الاحتمالي والتأكدي.
- التعرف علي الأسس العلمية لاختبارات تعريف (الاختبارات التأكديّة) لميكروب *E. coli*.
- التدريب علي القيام بالاختبارات التأكديّة لميكروب *E. coli*.

# الأجهزة والأدوات

- حضان كهربى.
- ماصات زجاجية معقمة ومعها صاحب بلاستيك.
- ماصات ميكرولتريية.
- أسنان ماصات ميكرولتريية (Tips) معقمة.
- ابر تلقىح.
- شرائح زجاجية.

## المواد والمزارع

- أنابيب LST أو BGLB أعطت نتائج موجبة في الاختبارين الاحتمالي والتأكيدي في الدرس العملي السابق.
- بيئة E. coli (EC) broth السائلة معقمة وموزعة في أنابيب اختبار تحتوي علي أنابيب درهام مقلوبة.
- بيئة Eosin methylene blue (EMB) agar الصلبة معقمة ومصبوبة في أطباق بتري.
- بيئة الأجار المغذي (Nutrient agar) معقمة ومصبوبة في صورة أجار مائل في أنابيب اختبار.

- بيئة التربتون أو التربتوفان السائلة (Tryptone broth) (TB) معقمة وموزعة في أنابيب اختبار.
- كشاف كوفاك (Kovac's reagent).
- بيئة أحمر الميثيل- فوجس بروسكور (MR-VP) معقمة وموزعة في أنابيب اختبار.
- كرياتين (Creatine).
- دليل أحمر الميثيل.
- المحاليل اللازمة للصبغ بطريقة جرام وتشمل محلول صبغة الكريستال البنفسجي، محلول صبغة السفرانين، محلول اليودين، كحول إيثيلي (٩٥%).
- بيئة Koser citrate broth السائلة معقمة وموزعة في أنابيب اختبار.

## اختبار قدرة المزارع البكتيرية علي تخمير اللاكتوز في بيئة EC السائلة علي درجة حرارة ٤٥.٥°م

- ترج أنابيب LST أو BGLB الموجبة ثم يؤخذ منها مل عقدة (Loopfull) إبرة تلقيح وتنقل إلي أنبوبة محتويه علي بيئة EC السائلة ويتم تحضين البيئة علي درجة حرارة ٤٥.٥°م لمدة ٤٨ ساعة.
- تفحص الأنابيب لتبين مدي تكون الغاز في أنابيب درهام الموجودة بها والذي يدل في هذه الحالة علي أن هناك بكتريا قولون برازیه المصدر في العينة المختبرة.

## صفات المستعمرات الناتجة من المزارع السابقة علي بيئة EMB الصلبة

- يتم رج أنبوبة EC الموجبة ونأخذ منها ملء عقدة إبرة تلقيح ليتم تخطيطها علي سطح بيئة EMB الصلبة المصبوبة في أطباق ثم يتم التحضين علي ٣٥°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.
- تفحص الأطباق من حيث ظهور مستعمرات ذات مركز غامق اللون وقد تكون ذات لمعة معدنية مخضرة.

# تفاعل خلايا المستعمرات النامية علي بيئة EMB مع صبغ جرام

- يتم أخذ لمستين منفصلتين بإبرة التلقيح من مستعمرتين ناميتين علي طبق EMB بالصفات السابق ذكرها ثم يتم فحصها بصبغ جرام كما سبق أن فعلت في الدروس العملية السابقة.
- تظهر خلايا *E. coli* تحت المجهر في شكل عصويات قصيرة سالبة لجرام.

## تفاعلات عزلات من المستعمرات النامية علي بيئة EMB مع اختبارات الایمفیک.

- يمكن أن تجري اختبارات الایمفک باستخدام لمسات بإبرة التلقيح من المستعمرات النامية علي الأطباق، ولكن من الأفضل أن يتم تخطيط اللمسات علي أجار مائل من بيئة مغذية مثل الأجار المغذي ( Nutrient agar) ويتم تحضينها علي ٣٥°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة وعند ذلك يطلق علي المزرعة عزلة (Isolate) وتؤخذ منها لمسات لإجراء الاختبارات المختلفة كما يلي:

## ١- اختبار الاندول

- يتم تلقيح بيئة التربتون أو التربتوفان السائلة (Tryptone broth (TB)) بلمسة من الميكروب ثم يتم التحضين علي ٣٥°م لمدة ٢٤ ساعة.
- يضاف ٠.٢-٠.٣ مللي من كشاف كوفاك (Kovac's reagent) إلي المزرعة بعد التحضين ويعتبر الاختبار موجباً في حالة ظهور لون أحمر في الطبقة العليا من البيئة.

## ٢- اختبار الفوجس بروسكو

في هذا الاختبار يتم الكشف عن قدرة الميكروب علي تخمير سكر الجلوكوز وإنتاج مركب الاسيتوين (Acetoin) ، وتتلخص خطواته فيما يلي:

● يتم تلقيح بيئة أحمر الميثيل- فوجس بروسكور

(MR-VP) بلمسه من الميكروب ثم يتم التحضين علي ٣٥°م لمدة ٤٨ ساعة.

● ينقل ١ مللي من العينة بعد التحضين إلي أنبوبة فارغة ويضاف ٠.٢ مللي محلول هيدروكسيد الصوديوم (تركيزه ٤٠%) مع الرج ثم يضاف من ٢ إلي ٣ بللورات من الكرياتين (Creatine) وترج الأنبوبة وتترك لمدة ساعتين ويعتبر الاختبار موجباً إذا تكون لون وردي بالأنبوبة.

### ٣- اختبار أحمر الميثيل

q في هذا الاختبار يتم الكشف عن قدرة الميكروب علي تخمير الجلوكوز وإنتاج أحماض، ويتم إجرائه عقب الاختبار السابق وذلك كما يلي:

- يتم تحضين أنبوبة MR-VP لمدة ٤٨ ساعة أخري علي ٣٥°م وذلك بعد إجراء اختبار الفوجس بروسكور السابق.
- يضاف ٥- ٦ نقاط من دليل أحمر الميثيل إلي الأنبوبة بعد التحضين، ويعد ظهور لون أحمر نتيجة إيجابية بينما اللون الأصفر يعنى أن الاختبار سلبي.

## ٤- اختبار استخدام السترات كمصدر للكربون

q في هذا الاختبار يتم الكشف عن قدرة الميكروب علي استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون العضوي في بيئة الزرع، ويتم إجرائه كما يلي:

- يتم تلقيح بيئة Koser citrate السائلة بلمسه من الميكروب ثم تحضن لمدة ٩٦ ساعة علي ٣٥°م.
- تفحص الأنابيب من حيث تكون عكاره بها حيث يدل ذلك علي أن الاختبار موجب

ومن خلال هذه الاختبارات يمكن التعرف علي *E. coli* والتي يظهر منها طرازان (Types) كما يلي:

Test	I	M	Vi	C
<i>E. coli</i> type 1	+	+	-	-
<i>E. coli</i> type 2	-	+	-	-