

الدرس العملي التاسع

الكشف عن ميكروب

Staphylococcus aureus

في اللبن ومنتجاته

أهداف الدرس

- التعرف بميكروب *Staphylococcus aureus* وأهم المنتجات الغذائية التي ينتقل عن طريقها.
- تقدير خطورة تلوث المنتجات اللبنية بميكروب *Staphylococcus aureus*.
- التدريب علي طرق الكشف عن ميكروب *Staphylococcus aureus* في عينات اللبن ومنتجاته.

الأجهزة والأدوات

- حضان كهربى.
- ناشرات (Spreaders) زجاجية أو بلاستيكية.
- ماصات زجاجية معقمة ومعها ساحب بلاستيك.
- ماصات ميكرولتريية.
- أسنان ماصات ميكرولتريية (Tips) معقمة.
- إبر تلقىح.

المواد

- عينات من اللبن الخام والجبن الدميّاطي.
- بيئة بارد باركر الصلبة (Baird-Parker agar (BPA)) معقمة ومصبوبة في أطباق بتري معقمة.
- بيئة تربتون الصويا الصلبة (Tryptone soy agar (TSA)) معقمة ومصبوبة في أنابيب اختبار في صورة أجار مائل (Slant).
- بيئة تربتون الصويا السائلة (Tryptone soy broth (TSB)) المضاف إليها ١٠% كلوريد صوديوم + ١% بيروفات صوديوم وثم تعقيمها وتوزيعها بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار.
- 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.

q الكشف عن تلوث اللبن الخام بميكروب *Staphylococcus aureus*

- قم بتجهيز عينة اللبن الخام وتحضير تخفيفات عشرية منها كما سبق أن فعلت في الدرسين العمليين السابقين.
- يتم أخذ ١ مللي من التخفيفات المناسبة (قرر مع زملائك والمشرف علي الدرس العملي التخفيفات التي يجب أخذها) ويتم توزيعه بمعدل ٠.٣ ، ٠.٣ ، ٠.٤ مللي علي ثلاثة أطباق تحتوي علي بيئة بارد باركر الصلبة (Baird-Parker agar (BPA)) (انظر شكل ١٢) ثم يتم نشر هذه الكميات علي سطح البيئة باستخدام ناشر (Spreader) مناسب وتترك الأطباق لمدة ١٠ دقائق بحيث تمتص البيئة الكمية المضافة من السائل وإذا وجد أن السائل لم يتم امتصاصه وما زال ظاهراً علي سطح البيئة فإن الأطباق تنقل إلي الحضان وتترك لمدة ١ ساعة علي درجة حرارة ٣٥°م ثم يتم قلبها بعد ذلك وتترك لمدة ٤٨ ساعة علي نفس الدرجة، تحفظ الأطباق في الثلاجة لحين فحصها في الدرس العملي التالي

● تفحص الأطباق من حيث صفات المستعمرات النامية عليها وتفضل الأطباق المحتوية علي ٢٠-٢٠٠ مستعمرة، ويظهر ميكروب S. aureus علي سطح بيئة BPA في صورة مستعمرات ذات لون يتدرج بين الرمادي إلى الأسمر الغامق وعادة ما تكون محاطة بهالة رائقة، ويرجع ذلك إلي قدرة الميكروب علي اختزال ملح التوليرات (Tellurite) الموجود بالبيئة إلي توليريم (Tellurium) الذي يكسب المستعمرات لوناً غامقاً، كما أن الميكروب يستطيع تكوين إنزيم الليسيزينيز (Lecithinase) الذي يحلل الليستين (Lecithin) الموجود في صفار البيض (Egg yolk) المضاف إلي البيئة وبالتالي تظهر هالة رائقة محيطة بالمستعمرة.

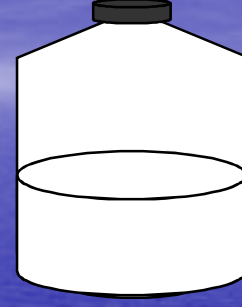
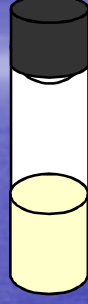
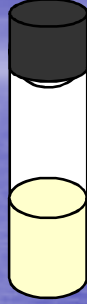
● يتم عد المستعمرات التي تعطي الصفات المميزة للميكروب في كل طبق، ويتم اختيار عدد من ١-٣ مستعمرة من كل طبق وتؤخذ لمسة من كل مستعمرة علي حدة ثم يتم تخطيط تلك اللمسات علي سطح بيئة مغذية غير متخصصة مثل بيئة تربتون الصويا (Tryptone soy agar (TSA)) المصبوبة في أنابيب أجار مائل

٢- إجراء تخفيفات عشرية

التخفيف الأول
(١٠-٣)

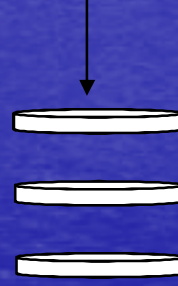
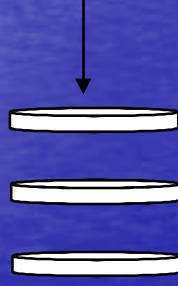
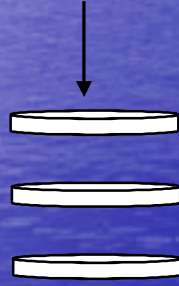
التخفيف الأول
(١٠-٢)

نقل ١ مللي من اللبن الخام إلي محلول التخفيف الأول
(١٠-١)



يتم أخذ ١ مللي من التخفيف
وتوزيعه علي ٣ أطباق بتري

أطباق بتري تحتوي
علي بيئة BPA



٠.٣ مللي

٠.٣ مللي

٠.٣ مللي

تقدير أعداد ميكروب *S. aureus* في عينة لبن خام باستخدام
طريقة العد علي الأطباق.

q الكشف عن تلوث الجبن الـدميـاطي بميكروب *Staphylococcus aureus* مع تقدير أعداده بطريقة الرقم الأكثر احتمالاً

- قم بتجهيز عينة الجبن الـدميـاطي وتحضير تخفيفات عشرية منها كما سبق أن فعلت في الدرسين العمليين السابقين.

- يتم أخذ ١ مللي من التخفيفات المناسبة (قرر مع زملائك والمشرف علي الدرس العملي التخفيفات التي يجب أخذها) ويتم تلقيح كل ١ مللي في أنبوبة اختبار تحتوي علي ٩ مللي من بيئة تربتون الصويا السائلة TSB المضاف إليها ١٠% كلوريد صوديوم + ١% بيروفات صوديوم، ثم تنقل الأنابيب بعد التلقيح إلي الحضان وتترك لمدة ٤٨ ساعة علي درجة حرارة ٣٥°م، وتعرف هذه الخطوة بالتنشيط الانتخابي (Enrichment) حيث يتم فيها تثبيط البكتريا المنافسة لميكروب *S. aureus* والموجودة في العينة المختبرة مع السماح له بالنمو حيث أنه يتحمل التركيزات المرتفعة من الملح.

• يتم رج الأنابيب جيداً ثم يؤخذ ملء عقدة إبرة تلقيح (Loopful) من كل أنبوبة ويتم تخطيطها علي سطح بيئة بارد باركر الصلبة (Baird-Parker agar (BPA)) وتنقل الأطباق إلي الحضان وتترك لمدة ٤٨ ساعة علي درجة حرارة ٣٥°م ثم تحفظ في الثلاجة لحين فحصها في الدرس العملي التالي، وذلك كما سبق في طريقة العد علي الأطباق، مع ملاحظة أننا هنا لا نهتم بعدد المستعمرات حيث أن الكثير منها سوف يكون متداخلاً ولكن ما يجب تسجيله هو عدد الأنابيب من بيئة TSB التي أعطت مستعمرات مميزة للميكروب عند تلقحها علي سطح بيئة BPA، حيث أننا من خلال هذا العدد يمكننا الحصول علي تقدير تقريبي لأعداد الميكروب في العينة كما سنري فيما بعد، وهنا أيضاً سوف نقوم بأخذ ١-٣ مستعمرة من كل طبق للتأكد من أنها تخص الميكروب من خلال الاختبارات التأكيدية التي سوف نقوم بها في الدرس العملي التالي

إعداد عينة الجبن الدمياطي وهرسها مع محلول التخفيف بنسبة ٩:١ وذلك في الهاون أو باستخدام الخلاط أو جهاز Stomacher

٢- يؤخذ ١ مللي من العينة لإجراء التخفيفات العشرية

