

## الأدلة المايكروبية Microbial Indicators

ان عملية تحديد او الكشف عن تلوث الاغذية والمياه بالاحياء المجهرية وخاصة البكتريا المرضية يحتاج الى جهد كبير ووقت طويل اذ ان عملية الكشف عن التلوث ببعض انواع البكتريا المرضية يستمر فترة طويلة نسبيا لذلك يتم اللجوء الى الكشف عن بعض مجاميع او انواع الاحياء المجهرية كدليل على تلوث الاغذية والمياه بلاحياء المرضية او على الاقل يعطي دليل على الاحتمالية العالية لحصول مثل هذا التلوث , وعلى العموم فان الدليل الميكروبي يفيد في :-

1. فحص العينات والحكم عليها خلال فترة زمنية قصيرة.
2. احتمالية تلوث الاغذية ببراز الانسان والحيوانات .
3. من الممكن ان يعطي الدليل مصدر تلوث الاغذية فيما اذا كانت من مصادر مخلفات الانسان او الحيوانات او المصادر الاخرى.
4. ان انواع البكتريا المرضية كثيرة جدا ومن الصعب عزلها او تشخيصها في وقت واحد لعينة غذائية معينة لذلك فان الدليل الميكروبي ذو فائدة كبيرة في تحديد التلوث بالبكتريا المرضية بصورة عامة.

ويعد تلوث المياه واحدا من المشاكل الكبيرة التي تعاني منها المجتمعات لمال هذا التلوث من تاثيرات سلبية سواء ما يتعلق بالاستخدام المباشر للمياه في الغسيل وغيرها او دخول هذه المياه في التصنيع الغذائي مما يعمل على نقل الاحياء المجهرية بعدئذ الى الانسان فيحصل التسمم الغذائي او الامراض الناشئة بسبب الاغذية وخاصة العدوى الغذائية food in fection .

وهناك مجاميع كثيرة من البكتريا تلوث الاغذية والمياه مثل بكتريا الكوليرا *Vibrio cholera* و *S.typhi* و *E.coli* والآخره وهي واحده من مجموعة ال *Coliforme* ذات اهمية بالغة كونها احد مجاميع البكتريا التي يستدل منها على التلوث بمخلفات الانسان والحيوان وخاصة في المياه . كما قد يحصل التلوث بانواع اخرى ذات اهمية كبيرة في صحة الانسان مثل بكتريا *Compyiobactor sp.* و *Shigella sp.* وانواع اخرى من البكتريا وكذلك الطفيليات .

جرى الاستعانة ببعض مجاميع واختبارات الاحياء المجهرية للدليل على التلوث بالمسببات المرضية .وقد تم استخدام الادلة التالية كدليل على تلوث الاغذية والمياه بالاحياء المجهرية المرضية:-

1. دليل العد الكلي للبكتريا.
2. دليل التلوث بالمخلفات وخاصة الكشف عن بكتريا ال E.coli .
3. مايسمى Index and model organisms وهو مجموعة او انواع من البكتريا يستدل منها على وجود انواع محدهه من البكتريا المرضية او المسببة للتسمم مثلا فان التلوث ببكتريا E.coli يعطي مؤشر على التلوث ببكتريا السالمونيلا وكذلك بعض الفيروسات المعوية للانسان والتي مصدرها المخلفات.

الجزء العملي :-

1. اجراء العد الكمي للبكتريا وذلك :
  - أ . اجراء التخفيف اللازمة للعينة وذلك بينقل 1مل من المادة الغذائية السائلة او 1غرام من المادة الصلبة للغذاء الى انبوب ماء مقطر معقم يحوي 9مل للحصول على التخفيف الاول 10<sup>-1</sup> للمادة المراد فحصها.
  2. تكمل التخفيف لحد 10<sup>-5</sup> اي 1/100.000.
  3. ينقل 1مل من التخفيفين الاخيرين /10.000/ و 1/100.000 الى اطباق بتري معقمة (مكررين)
4. ويصب وسط ال Nutrient Agar الغذائي المعقم وتحرك الاطباق وتترك لكي تتصلب ثم تحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 48ساعة.
5. تعد المستعمرات النامية على الطبق وتضرب في مقلوب التخفيف للحصول على اعداد البكتريا.

عدد البكتريا / 1 سم<sup>3</sup> من العينة الأصلية = معدل عدد الخلايا في المربع الواحد × معامل الشريحة (٤ × ١٠<sup>-٦</sup>) × معكوس التخفيف (ان وجد).

6- اجراء عد بكتريا E.coli ومن التخفيفين السابقين وبخطوات مشابه للعدد الكلي مع استخدام الوسط الغذائي الماكونكي اكار.

Yuosra Amer Ali

## عزل بكتريا ال Bacillus

### جنس Bacillus

يتكون من عصيات موجبة لصبغة كرام Gram-positive في مراحل النمو المبكرة (24 ساعة الأولى من النمو) بعد ذلك تتغير الصبغة ما بين موجبة إلى سالبة لصبغة غرام فلهذا يعرف جنس Bacillus يكون متغيراً لصبغة كرام .

تتواجد أفراد هذا الجنس بشكل واسع في مختلف البيئات حيث توجد في التربة بشكل واسع جداً، وفي المواد المالحة بنسبة قليلة كما وتتواجد في البيئات الحارة (65م°) والبيئات الباردة (5م°) ويتصف هذا الجنس بأن بعض أفرادها لها القدرة على تلويين الأغذية المعلبة والحليب المعقم والخبز وبعضها الآخر له أضرار على الصحة إذ يسبب بعض الامراض كالتسمم الغذائي والجمرة الخبيثة.

الصفات المظهرية للخلية وحجمها يتباين ما بين الانواع ابعادها (0.3- 2.2 × 7- 2.1 ميكرومتر)، معظم أنواعها تنتج أنزيم الكاتاليز في حين تكون بعض أنواعها موجبة لانتاج انزيم الاوكسيديز وبعضها تكون سالبة له ، غالبا ما تعزل هذه البكتريا من التربة وبعض البيئات الاخرى مثل الماء والغذاء والعينات الطبية ، وتكون سبوراتها مقاومة للحرارة والاشعة والجفاف والمواد المطهرة ويعود سبب هذه المقاومة لاحتوائها على dipicolinic acid بنسبة 5-15 % من الوزن الجاف ، معظم أنواعها تكون غير مرضية للانسان أو الحيوان ماعدا B. anthracis المسببة للجمرة الخبيثة.

أجريت اول دراسة تصنيفية عام (1946) من قبل الباحث Smith وجماعته حيث اعتمد بهذا التصنيف على دراسة الصفات المظهرية والكيموحيوية وقد تم تحديد (19) نوعاً لجنس (Bacillus) واستكمل التصنيف من قبل الباحث (Gorden) وجماعته عام (1973) إذ تم إضافة ثلاثة أنواع ليصبح عدد جنس (Bacillus) في ذلك الوقت (22) نوعاً وجميع هذه الأجناس تتصف بكونها بكتريا عصوية وموجبة لصبغة غرام ومنتجة للأبواغ الداخلية/ وتكون هوائية لا هوائية اختيارية.

إنّ هذا التوسع في جنس Bacillus عكس أهمية الوراثة الجزيئية في الكشف عن الاختلافات الجينية بين الأنواع المتشابهة مظهرياً لأفراد هذا الجنس، وهناك عدة أنواع من هذه البكتيريا على رأسها Bacillus وهي بكتيريا هوائية عصوية توجد طبيعياً في التربة والماء، ويحدث التسمم الباسيلي بسموم الـ B. Cereus وهي موجبة لصبغة غرام، تتحول هذه البكتيريا الى ابواغ بسهولة في الغذاء لذلك فإنها تقاوم المعاملة الحرارية وبالتالي تنمو الابواغ وتتكاثر وتسبب التسمم كما أن الأغذية التي تنقل بكتيريا Bacillus هي غالباً أغذية نشوية، لكن ابواغ هذه البكتيريا لا تقاوم الحرارة العالية حيث وجد أن تعرضها للحرارة على درجة 100م° لمدة 30 دقيقة يقضي عليها، وهذه ميكروبات هوائية اختيارية وتنمو في مدى من درجات الحرارة يتراوح من 10 - 48م° والحرارة المثلى لنموها تتراوح من 35 - 45 م° تظهر الأعراض ما بين 8 ال 16 ساعة وتزداد شدتها بداية بشعور بالغثيان ومغص وألم في

البطن وإسهال مائي مع غياب للحمي وهي تشابه أعراض مسببة التسمم البوتوليوني.

عزلت هذه البكتيريا بصورة واضحة في أطباق الأرز و الذرة والبطاطا المطبوخة و الخضروات والحم المفروم والسجق المصنوع من الكبد و الحليب المطبوخ بالحـم والشوربات , كما وجد أن لبكتيريا *Bacillus cereus* علاقة ببعض عيوب الحليب ، مثل النكهة غير المرغوبة ، التخثر الحلو والقشدة المرة بفعل الإنزيمات المحللة للبروتين ، و إن الجمع بين خاصيتي المقاومة للحرارة وتفضيل البيئة الباردة يمثل سبباً مهماً لبكتيريا *Bacillus cereus* ليجعلها من أهم الأسباب المسببة لفساد المنتجات اللبنية.

كما ان التلوث بالبكتيريا قد ظهر في الأغذية المطهية والتي تُركت لفترات طويلة من الوقت عند درجات حرارة الغرفة وحتى تقديمها ,حيث انه تسخين الأغذية يحفز تحول الابواغ الى الحالة الخضرية مسببة المرض , وقد وجد ان التسمم الغذائي ببكتيريا *Bacillus* غالباً كان مرتبطاً بأكل الحبوب المسخنة مرة ثانية.

الجزء العملي :-

1. اجراء العد الكمي للبكتريا وذلك :

أ . اجراء التخفيف اللازمة للعينة وذلك بينقل 1مل من المادة الغذائية السائلة او 1غرام من المادة الصلبة للغذاء الى انبوب ماء مقطر معقم يحوي 9مل للحصول على التخفيف الاول 10<sup>-1</sup> للمادة المراد فحصها.

2. تكمل التخفيف لحد 10<sup>-5</sup> اي 1/100.000.

3. ينقل 1مل من التخفيفين الاخيرين /1/10.000 و 1/100.000 الى اطباق بتري معقمة (مكررين) .

ملاحظة :- استعمل ماصات جديدة عند تحضير كل تخفيف ( طبقين لكل تخفيف )

4. باتباع الشروط الواجب مراعاتها في التعقيم انقل 1مل من التخفيفات السابقة ( استعمل ماصة جديدة مع كل تخفيف ) في أطباق بتري معقمة ثم أضف إلى الأطباق حوالي 15 مل من مستخلص الكلوكوز والتبتون مضافاً إليها الأكار ثم رج الأطباق بحركات خفيفة إلى الأمام وإلى الخلف حتى يتم خلط التخفيفات السابقة مع البيئة ثم اترك البيئة حتى تتصلب ، اعمل أطباقاً للمقارنة بإضافة الماء المعقم .

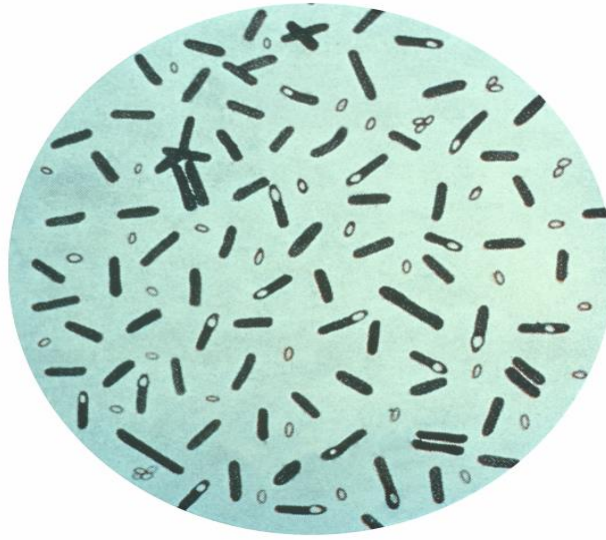
5. تعد المستعمرات النامية على الطبق وتضرب في مقلوب التخفيف للحصول على اعداد البكتريا.

عدد البكتريا / ١ سم<sup>٣</sup> من العينة الأصلية = معدل عدد الخلايا في المربع الواحد × معامل الشريحة (٤ × ١٠<sup>٦</sup>) × معكوس التخفيف (ان وجد).

٥ - بعد إنتهاء فترة الحضانة عد المجاميع البكتيرية التي في الأطباق ثم حدد البكتيريا في ١ مل من عينة الحليب مثلا وذلك بأخذ متوسط الطبقين لكل تخفيف ثم الضرب في مقلوب التخفيف . ضع النتائج السابقة في الجدول .

## بكتيريا التسمم الغذائي الـ *Clostridium*

تعتبر بكتيريا عصوية لاهوائية موجبة لصبغة كرام تُعرف باسم (*Clostridium botulinum*) ، ومعنى أنها لا هوائية أي أنها تنمو في غياب الأكسجين فقط ، لها القدرة على تكوين الأبواغ الجرثومية التي تمكنها من البقاء حية في حالة من السكون حتى تتعرض للظروف التي تدعم نموها .



*clostridium botulinum*

يحدث التسمم الغذائي البوتيولزمي عندما تنمو هذه البكتيريا وتفرز سموما في الأكل قبل تناوله، ويُعد سم البوتيولينم أكثر المواد المعروفة سمية على الإطلاق، كما تنتشر الأبواغ الجرثومية لهذا النوع من البكتيريا بشكل كبير في البيئة متضمنة التربة والأنهار ومياه البحر والمعلبات الغذائية الغير معقمة أيضاً.

تحدث عملية الإنبات البكتيرية وإفرازها للسموم في المنتجات المخزّنة في ظروف هوائية منخفضة مع إضافة عوامل أخرى كدرجة حرارة الحفظ والتخزين وإجراءات الحفظ الأخرى، فهي تحدث في الأغلب في الأطعمة التي تحفظ بظروف سيئة ولا تطهى جيداً.

لا تستطيع بكتيريا *clostridium botulinum* النمو في وسط حمضي PH أقل من (4.6) ولذلك فإنّ السموم لن تتكون في الأطعمة الحمضية، ولكن إضافة بعض الأحماض إلى الأطعمة لن يستطيع تكسير السموم التي سبق تكوينها بالفعل في اللحوم، ودمج عمليتي الحفظ في درجة حرارة منخفضة مع إضافة الملح و/أو الحامض يساعد على منع نمو البكتيريا، وبالتالي إفراز السموم ، كذلك بسبب مقدرة تلك الأبواغ الجرثومية على مقاومة الحرارة فإنّ السموم التي تفرزها في الظروف اللاهوائية يمكن القضاء عليها بالغليان (عند درجة حرارة أعلى من 85 ) درجة مئوية لمدة خمس دقائق أو أكثر.

انواع بكتريا ال **Clostridium** :-

1. *Clostridium Botulinum*

2. *Clostridium tetani*

3. *Clostridium perfringens*

4. *Clostridium sordellii*



Clostridium  
botulinum



Escherichia coli



Salmonella typhi



Clostridium  
tetani



Vibrio cholerae



Staphylococcus  
aureus



Streptococcus  
pyogenes



Helicobacter  
pylori

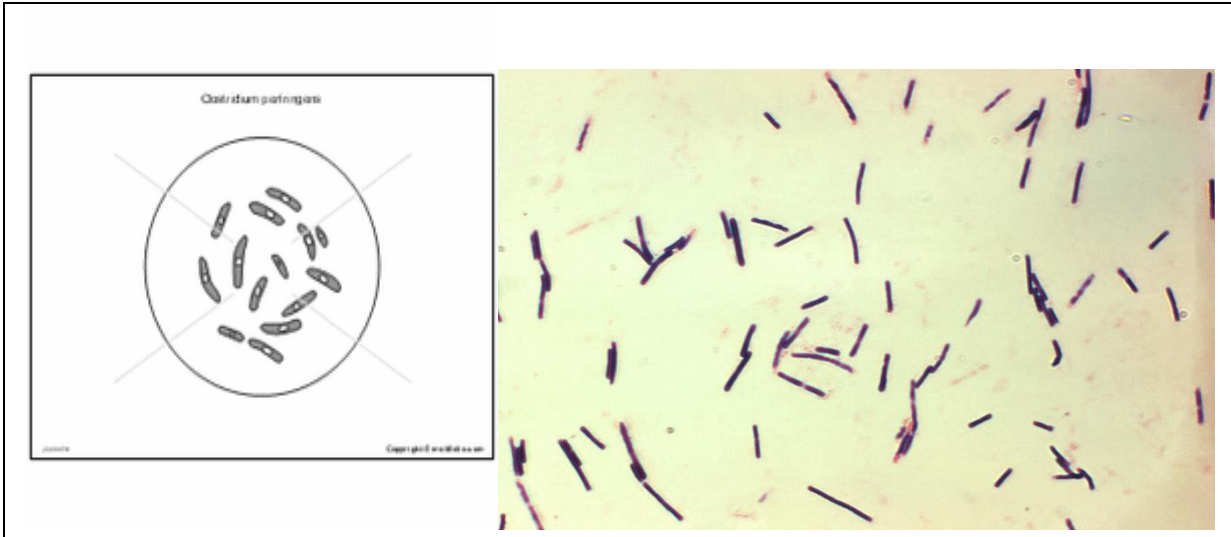


Clostridium  
Botulinum



Clostridium  
Tetani

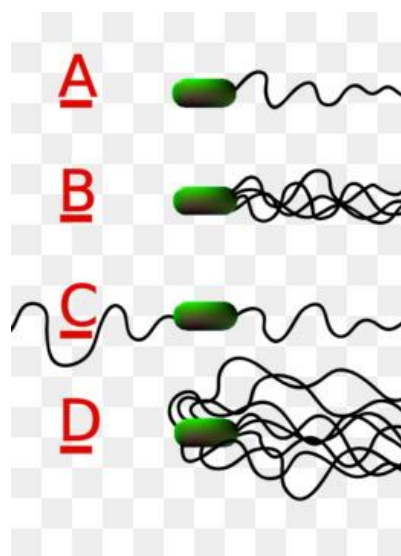




[Clostridium perfringens](#)

• التسمم البوتيولزمي الغذائي:-

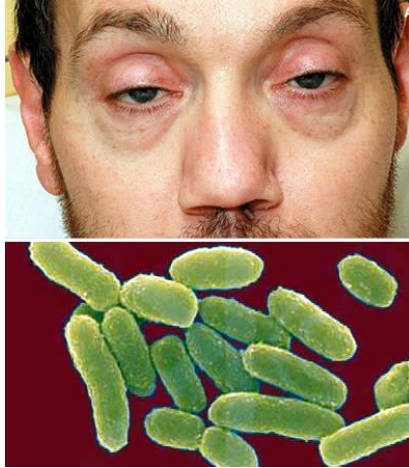
يُعتبر من الأمراض المميتة، وهو ينتقل عادة عن طريق ابتلاع وهضم السموم العصبية الموجودة بالأغذية الملوثة , ويحدث عندما تقوم بكتيريا (*clostridium botulinum*) بالنمو وإنتاج السموم في الغذاء قبل تناوله, هناك ثمانية أشكال متميزة من سموم هذه البكتيريا (A,B,C1,C2,D,E,F,G) أربعة من هذه الأنواع (A,B,E F) هي ما تسبب التسمم الغذائي في الإنسان، أمَّا الأنواع (C,D,E) فهي تسبب الأمراض في الثدييات الأخرى والطيور والأسماك.



انواع بكتريا *clostridium botulinum* .

• أعراض التسمم الغذائي:-

1. ازدواج وتشوش في الرؤية.
2. تهدل في الجفون.
3. تداخل في الكلام.
4. صعوبة في البلع.
5. جفاف في الحلق لا يزول أثره بتناول السوائل.
6. رغبة في القيء.
7. اتساع/ثبات حدقة العين.
8. دوخة.
9. ألم في المعدة.
10. ضعف في العضلات.



إذا لم يتم العلاج فإنّ هذه الأعراض قد تتدهور لتسبب شللاً في العضلات التنفسية والذراعين والأرجل والجذع, وتبدأ عادةً الأعراض في الظهور خلال 18 إلى 36 ساعة عقب تناول غذاء ملوث، وقد تقصُر هذه المدة فتصل إلى 6 ساعات، أو تطول فتصل إلى عشرة أيام.

المفاتيح الخمسة التي توصي بها منظمة الصحة العالمية هي كالاتي:

1. الاحتفاظ بالطعام نظيفاً.

2. الفصل بين الأطعمة المطهّوة والنيئة.

3. الطبخ جيّداً.

4. الاحتفاظ بالطعام في درجة حرارة آمنة.

5. استعمال المياه النظيفة.

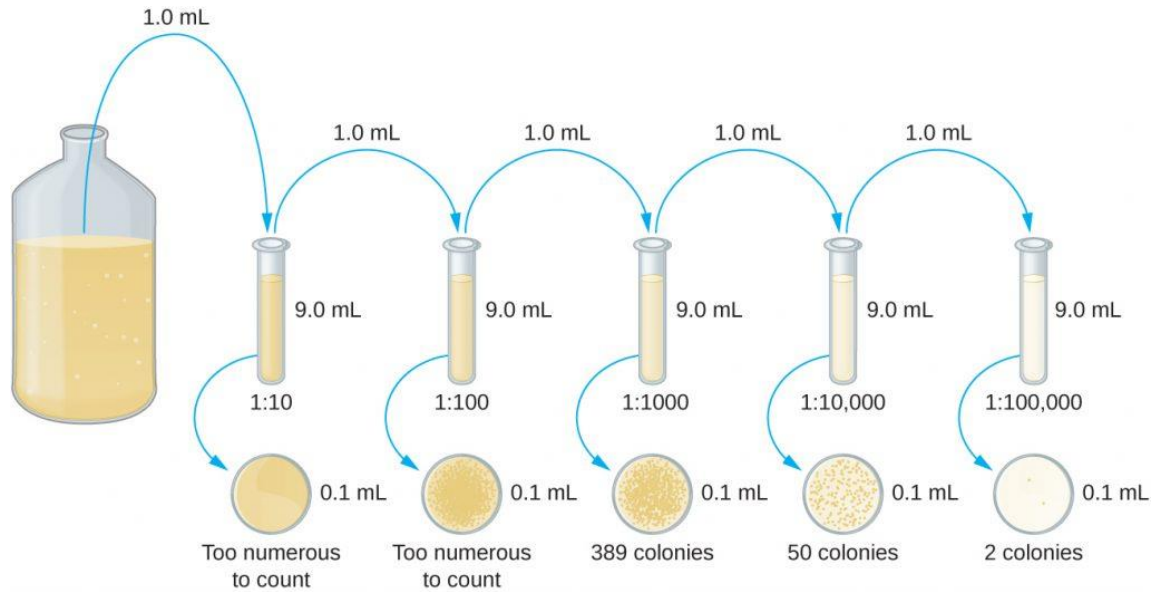
الاختبار:-

مواد العمل:-

1. اغذية معلبة منخفضة الحموضة (كالحوام المعلبة, اسماك, بزاليا معلبة او غيرها)
2. اطباق بتري معقمة.
3. وسط غذائي Nutrient Agar.
4. حمام مائي.
5. ماصات معقمة.
6. انابيب تحتوي ماء معقم(9مل).
7. مواد مخبرية اخرى.

طريقة العمل:-

1. تفتح علبة المادة الغذائية بعد تعقيم السطح قرب اللهب (مصباح بنزن) وعادة ترج قبل فتحها.
2. ينقل 1مل من المادة الغذائية السائلة او 1غرام من المادة الصلبة للغذاء الى انبوب ماء مقطر معقم يحوي 9مل للحصول على التخفيف الاول 10<sup>-1</sup> للمادة المراد فحصها.
3. تكمل التخفيف لحد 10<sup>-5</sup>.
4. يعامل التخفيفين الاخيرين بحمام مائي بدرجة حرارة 80م لمدة 15-35 دقيقة.
5. ينقل 1مل من التخفيفين الاخيرين (الخطوة الرابعة) الى اطباق بتري معقمة (مكررين) ويصب وسط ال Nutrient Agar وتحرك الاطباق وتترك لكي تتصلب ثم تحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 48ساعة في ظروف لا هوائية.
6. تعد المستعمرات النامية على الطبق وتضرب في مقلوب التخفيف للحصول على اعداد البكتريا.
7. ممكن عزل البكتريا وحفظها على انابيب اختبار تحوي Nutrient Agar مائل.



عمل التخفيف المتسلسلة للعينة المراد الكشف عنها كعينة لحوم معلبة.



يستخدم وسط ال Nutrient Agar وتصب في الاطباق المعقمة , وتحضن على 37م° /48ساعة.

## عزل وتنمية بكتريا ال Coli form

تعد مجموعة بكتريا القولون coliforme من المجاميع البكتيرية المهمة , كون هذه المجموعة من البكتريا التي تتضمن انواعا تستوطن القناة الهضمية للانسان والحيوانات وهذه المجموعة تعود الى العائلة Enterobacteriaceac , ان هذه البكتريا لها القابلية على تخمير سكر اللاكتوز , وان بعض انواعها تسبب امراضا للانسان مثل بكتريا E.Coli والتي تكون سموما داخلية في جدارها الخارجي .



Coliform

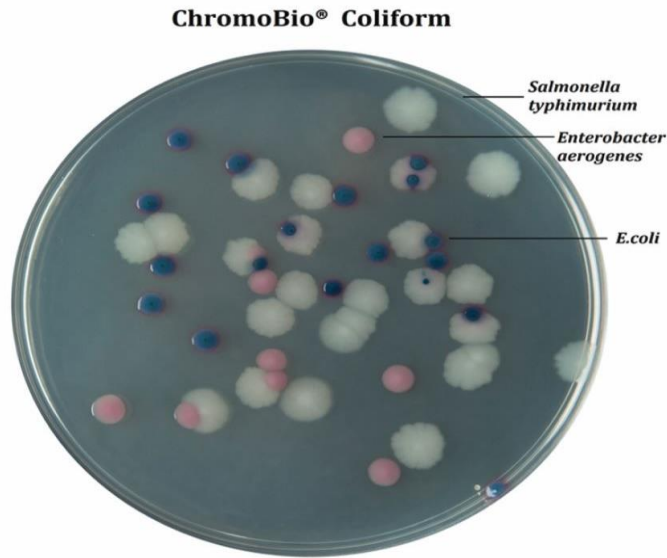
ان من اهم الاجناس في مجموعة coliforme الاجناس:-

Escherichia

Enterobactor

Klebsiella





## klebsiella

Microbiology



وقد تركزت البحوث والدراسات حول هذه المجموعة لاهميتها وسعة انتشارها وتعد دليل على تلوث الاغذية بالمواد البرازية ومخلفات الانسان والحيوان اذ ان تلوث الاغذية بهذه البكتريا وخاصة بكتريا E.Coli , وان هذه البكتريا سالبة لصبغة كرام وعصوية وغير مكونة للجراثيم.

الجزء العملي :-

في هذه التجربة يجب توفير المواد التالية:-

- 1- عينة ماء نهر او ماء ابار مجوفة.
- 2- بيئة ماكونكي اكار Mackonkey agar .
- 3- انابيب ماء مقطر تحوي 9مل (6 انابيب).
- 4- اطباق بتري معقمة.

## العمل:-

أ . اجراء التخافيف اللازمة للعينة وذلك بينقل 1مل من المادة الغذائية السائلة او 1غرام من المادة الصلبة للغذاء الى انبوب ماء مقطر معقم يحوي 9مل للحصول على التخفيف الاول 10<sup>1</sup>- للمادة المراد فحصها.

ب- تكمل التخافيف لحد 10<sup>6</sup>-اي 1/1000.000.

ج- ينقل 1مل من التخفيفين الاخيرين /1/100.000 و 1/1000.000 الى اطباق بتري معقمة (مكررين) .

ح- يجب تحضير في وقت مسبق بيئة ال Mackonkey agar ثم تعقيمها بجهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 م° وضغط اجو لمدة 15-20دقيقة.

خ- تضاف البيئة الى الاطباق ويتم تحريك الاطباق لتوزيع الوسط الغذائي.

د- بعد تصلب الوسط تحضن الاطباق بدرجة حرارة 73 م° لمدة 24 ساعة .

ذ- يتم عد المستعمرات وضربها في مقلوب التخفيف.



## عزل بكتريا Salmonella و Shigella

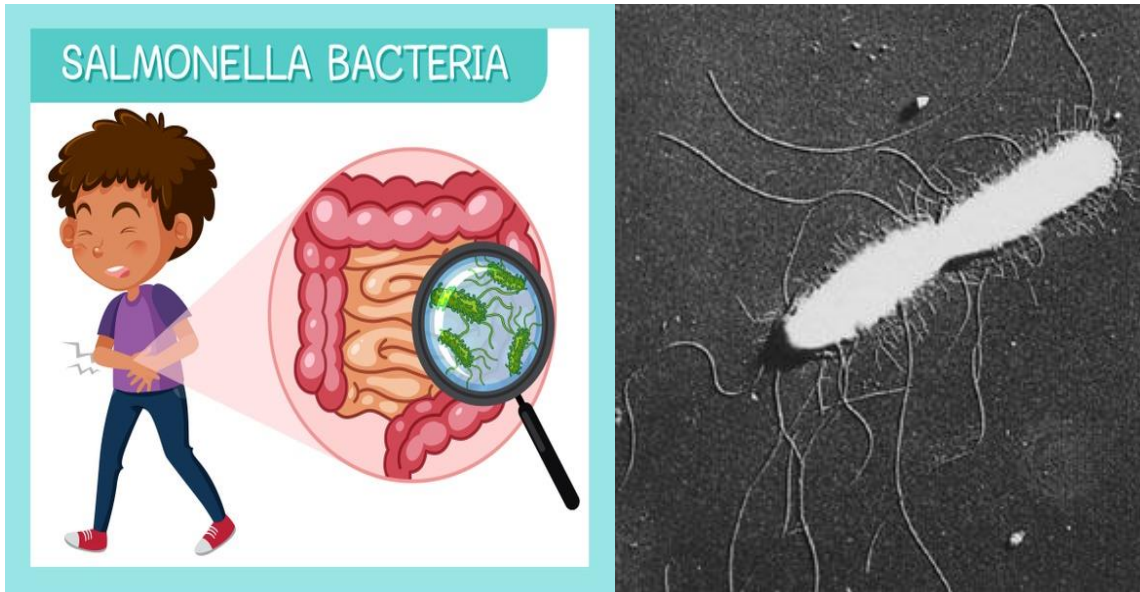
تعد بكتريا ال Salmonella و Shigella من الاجناس التي تضم العديد من الانواع المسببة للتسمم الغذائي بطريقة العدوى Food borne in Fection والتي تنتقل بواسطة الاغذية الى جسم الانسان حيث بعد وصولها الى الامعاء الدقيقة يتحلل جدار البكتريا ويصبح السم حرا حيث يؤثر في القناة الهضمية وتظهر الاعراض المرضية.

تعد بكتريا ال Salmonella من الانواع السالبة لصبغة كرام والمتحركة والهوائية او اختياريية , ولا تكون سبورات وعصوية وتنمو بدرجة حرارة 37م° اذ تكون مستعمرات بأبعاد 2-3ملم وذات لون رمادي -ابيض ودائرة تامة من ناحية حافة المستعمرات , وهناك ثلاث انواع من السالمونيلا تعد مرضية وهي:-

S.typhi

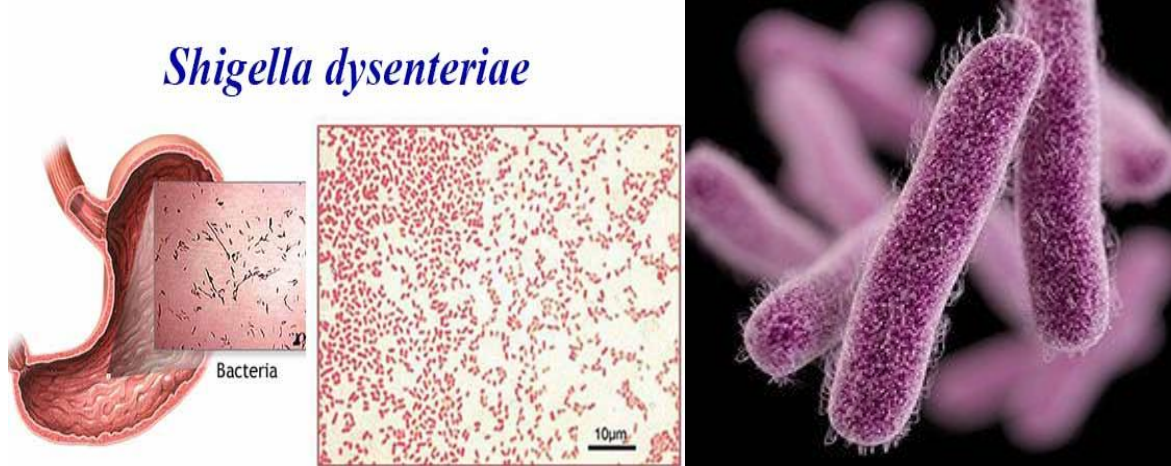
S.Para typhi

S.typhimurium



كما ان هناك حوالي 200 نوع يسبب التسمم الغذائي وتعد بكتريا Shigella ايضا من الانواع السالبة لصبغة كرام وغير متحركة وعصوية ولا تكون سبورات وتمنو بوجود او عدم وجود الهواء الا ان النمو الامثل يحصل في الظروف الهوائية وبدرجة حرارة 37م° ومن الصعب تمييزها بالاعتماد على الخواص المورفولوجية (الشكلية) ويتم تمييزها عن ال Salmonella بالاعتماد على بعض الخواص المصلية وتفاعلات التخمر.





بصورة عامة يتم التمييز بين *Salmonella* و *Shigella* باستخدام بيئة *Krused triple sugar agar* حيث تنمو بكتريا ال *Salmonella* في قعر الانبوبة الحاوية على البيئة وتكون لون اصفر مع وجود فقاعات غازية بينما *Shigella* تنمو وتكون لون اصفر بدون غاز. اهم اجناس او انواع بكتريا *Shigella* :-

*Sh.dysenteria*

*Sh.Sonnei*

الكشف عن بكتريا ال *Salmonella* و *Shigella* :-

مواد العمل :-

1. مادة غذائية مثل البيض او الحليب.
2. اطباق بتري معقمة.
3. انابيب اختبار تحوي 9مل ماء مقطر معقم فقط.
4. بيئة ( *S-S agar* ) *Salmonella – shigella agar*.

طريقة العمل:-

- 1- يؤخذ 1مل حليب او 1مل بيض (ويتم الحصول عليه بعد غسل القشرة للبيض بماء مقطر ثم يجمع هذا الماء) الى انبوبة اختبار معقمة تحوي 9مل ماء مقطر للحصول على التخفيف الاول  $10^{-1}$  للمادة المراد فحصها.
- 2- تكمل التخفيف لحد  $10^{-5}$  اي  $1/100.000$  باستخدام ماصات معقمة خاصة.
- ج- ينقل 1مل من التخفيفين الاخيرين  $1/10.000$  و  $1/100.000$  الى اطباق بتري معقمة (مكررين) , الى اطباق بتري معقمة قرب اللهب.

ح- يجب تحضير في وقت مسبق بيئة ال ثم تعقيمها بجهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121 م° وضغط اجر لمدة 15-20 دقيقة.

خ- تضاف البيئة الى الاطباق ويتم تحريك الاطباق حركة دائرية لتوزيع الوسط الغذائي.

د- بعد تصلب الوسط تحضن الاطباق بدرجة حرارة 73م° لمدة 24 ساعة .

ذ- يتم عد المستعمرات وضربها في مقلوب التخفيف.

ويلاحظ ظهور المستعمرات ذات هالة حمراء قانية (تلك المستعمرات التي لاتخمر سكر اللاكتوز في هذا الوسط الزراعي).

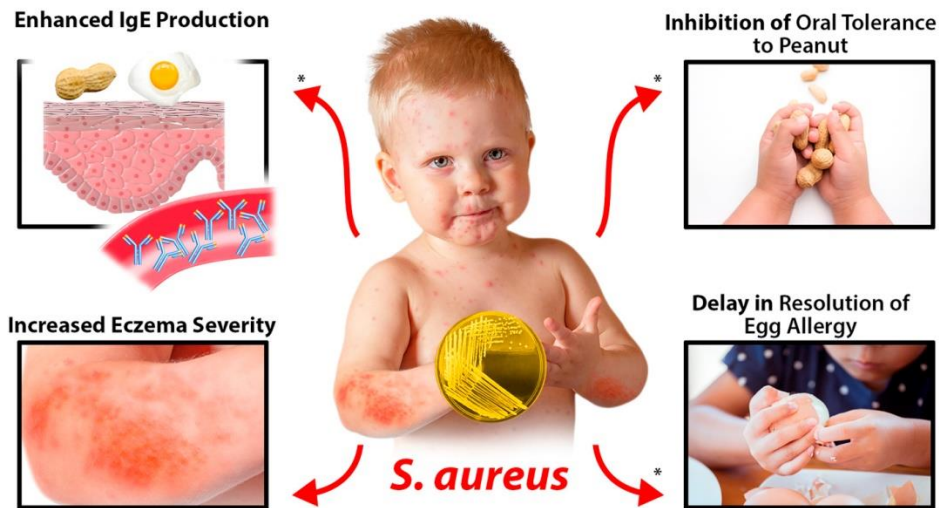
ويستخدم الوسط الغذائي Krumed triple sugar agar للتفريق بين انواع بكتريا ال Salmonella وال Shigella وفق ماذكر سابقا.

## الكشف عن بكتيريا الـ *staphylococcus aureus*

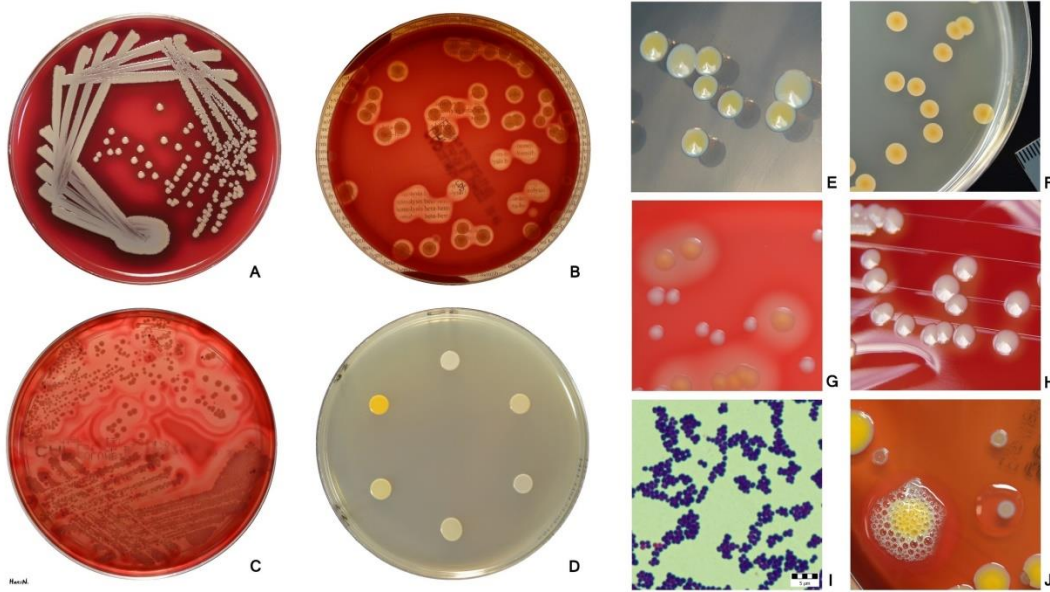
إن البكتيريا المسببة للتسمم stafylococcus تعود إلى جنس *staphylococcus* والنوع المرضي المسؤول عن كثير من المشاكل الصحية في الإنسان والحيوان هي **ST.** **aureus** وأول من أشار إلى مسؤولية هذه البكتيريا عن حالات التسمم الغذائي هو Denys عام 1894 تفرز ضروب هذه البكتيريا خمسة مجاميع من السموم هي A,B,C (C1,C2),E,D هذه البكتيريا كروية أو بيضوية بشكل عناقيد غير متحركة هوائية أو اختيارية لاهوائية وغير مكونة للسبورات موجبة لصبغة كرام . هذه البكتيريا تحلل الجلاتين وتختزل النترات (-NO<sub>3</sub>) إلى نتريت (NO<sub>2</sub>) وتنتج الأمونيا .

الأنواع المرضية منها تفرز أنزيم Coagulase وتخمر لأهوائياً سكر المانيتول وسكر الكلوكوز مع إنتاج الحامض وتكون مستعمرات ذات هالة صفراء او ذهبية في الوسط الغذائي الصلب الذي يحتوي هذا السكر بينما لاتحلل الأنواع المرضية من بكتيريا *staphylococcus* سكر المانيتول ويكون لون المستعمرات أبيض ,وان درجة الحرارة المثلى للنمو تتراوح من 35\_ 37 م° والـ PH الأمثل لنموها هو 7 .

### *S. aureus* and Food Allergy in early childhood



\* Association is independent of eczema severity



### staphylococcus aureus

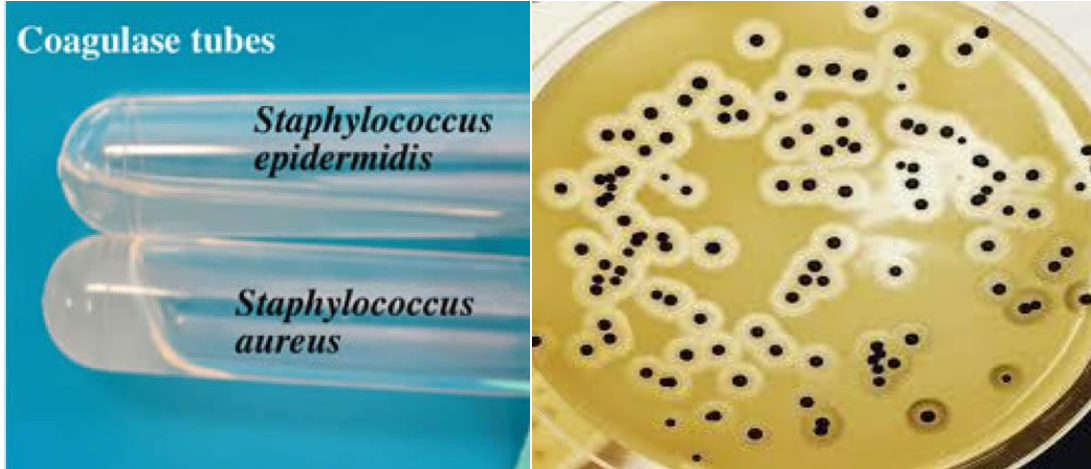
#### التمييز بين الأنواع المرضية وغير المرضية لبكتيريا ST. aureus

1. الأنواع المرضية لها القدرة على تكوين صبغات برتقالية أو صفراء ذهبية بينما غير المرضية بيضاء على بيئة Manitol salt agar.
2. اختيار التجمع Coagulate test يكون بإضافة قطرة من المزرعة إلى بلازما الدم ففي حالة الأنواع المرضية يحدث تجمع البلازما بينما لا يحدث للأنواع الغير مرضية .
3. بإضافة دليل Brome cresol purple على المستعمرات النامية بالأطباق فإذا ظهر لون أصفر يحيط بالمستعمرة يدل على وجود بكتيريا مرضية والسبب هو إن البكتيريا المرضية تخمر سكر المانتول وينتج حامض , فالحامض الناتج يعمل على تغيير لون الدليل من البنفسجي إلى الأصفر .
4. بإضافة 5مل من محلول كبريتات الامونيوم المشبعة على الأطباق وتترك الأطباق لمدة 10 دقائق ثم تفحص فإذا ظهرت هالة رائقة شفافة حول المستعمرات يدل على وجود البكتيريا المرضية والسبب هو تحلل الجلوتين إلى مواد أبسط .

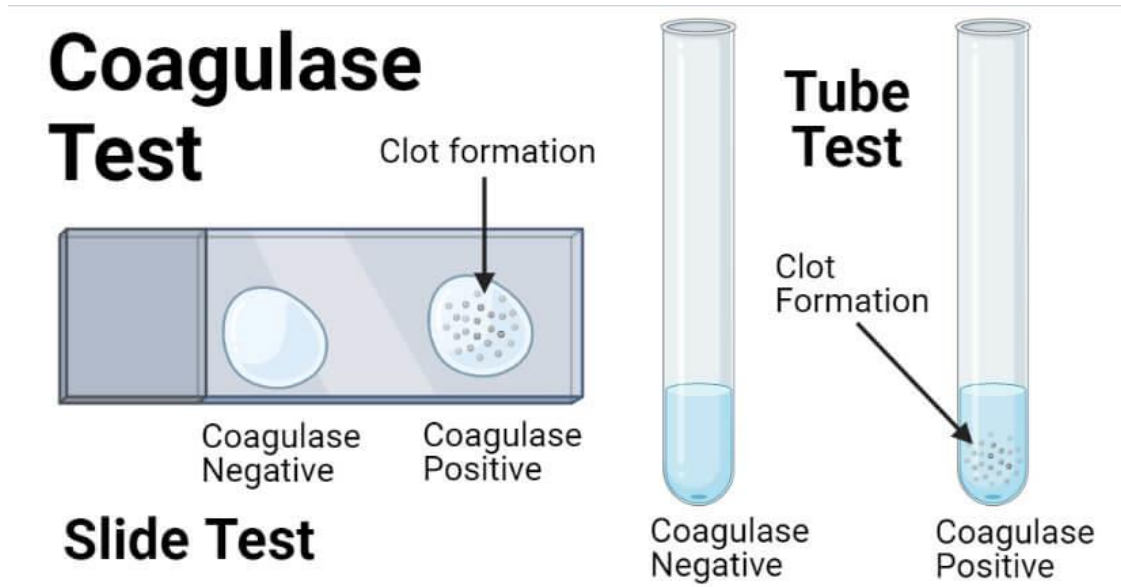
### الكشف عن وتشخيص بكتيريا ST. aureus

- (1) يحضر المستحلب الغذائي للمواد الصلبة وشبه الصلبة وتجري التخافيف المطلوبة مثلاً (لحد 1/100000) .
- (2) يحضر الوسط الزرعي Manuitol salt agar.
- (3) ينقل مقدار 0.1 مل وبواسطة ماصة معقمة من التخفيفين الأخيرين إلى سطح بيئة Manuitol salt agar المتصلبة في اطباق بتري معقمة وينشر جيداً بواسطة قضيب زجاجي معقم .
- (4) تحضن الأطباق بدرجة حرارة 32م° لمدة 48 ساعة ثم تحسب أعداد المستعمرات التي يحيطها هالة صفراء والتي تمثل بكتيريا **ST. aureus** الاحتمالية .
- (5) تنقل بعض المستعمرات من الأطباق إلى الوسط الزرعي السائل Brain Heart infusion بأنابيب اختبار وتحضن بدرجة حرارة 32 م° لمدة 24 ساعة
- (6) الفحص التاكيدي لتواجد أحد ضروب البكتيريا المرضية يكون بواسطة الفحص عن وجود أنزيم Coagulase ويلخص بمايلي : .
  - (a) يحضر بلازما دم الأنسان او الأرنب الطري أو استخدام بلازما الأرنب الجاف وذلك بإذابة فحوى الأنبوبة (100ملغم ) في 3سم<sup>3</sup> ماء مقطر معقم ثم يوزع المحلول إلى أنابيب صغيرة .
  - (b) تضاف قطرتان من المزرعة في البند الخامس اعلاه إلى كل أنبوبة اختبار تحتوي على محلول البلازما .
  - (c) تؤخذ القراءة بعد ساعة و4ساعات وتسجل النتائج على مدى تخثر البلازما الذي يدل على وجود أنزيم Coagulase أو عدمه حيث وجود الأنزيم دليل على أن البكتيريا هي من الأنواع المرضية .
 أو قد يتم التأكد من نوع البكتيريا بإجراء صبغ البكتيريا (صبغة كرام ) ثم تحديد شكلها (عنقودية ) ثم ينقل قليل من المزرعة البكتيرية وتوضع شريحة

زجاجية مايكروسكوبية سبق وأن وضع فوقها كمية من بلازما الأرنب فإذا تخثرت البلازما خلال ثوان يعتبر الفحص عن البكتيريا المرضية موجباً أما إذا كان التخثر بطيئاً أو لم يحصل التخثر فإن الأختبار سالباً .



اختبار انزيم Coagulase



## إنتاج سموم الأفلاتوكسين في الأوساط المختبرية ( التركيبية )

تُعتبر السموم الفطرية من أخطر السموم على صحة الإنسان والحيوان، وأشهرها الأفلاتوكسين حيث يعتبر أخطرها على الإطلاق، فهو يوجد في عدد كبير من الأطعمة، ويكفي أن يتعرض الشخص لكمية ضئيلة منه، لا تتعدى أجزاء من المليون، كي تؤدي به، إن سموم الأفلا هي نواتج أيضية ثانوية تنتج من الفطرين

### A. parasiticus و Asperigillus flavus

وذلك عند نموها على الأوساط الزرعية المختبرية والطبيعية (الأغذية) كالذرة والرز والحنطة والشعير وفسق الحقل وبذور القطن وغيرها . وهي مواد سامة للإنسان والحيوان تدخل سموم الأفلاتوكسين إلى جسم الإنسان إما بطريقة مباشرة بواسطة الأغذية، وإما بطريقة غير مباشرة من خلال تناول منتجات مصدرها حيوانات سبق لها أن تغذت على أعلاف ملوثة بالسموم الفطرية، وهي الأخطر خصوصاً على الأطفال ، وتسبب سرطان الكبد والكلبتين ومثبط للجهاز المناعي ويؤثر في العديد من الأنظمة الحيوية والفعاليات الحيوية لجسم الإنسان والحيوان .

إن أهم هذه السموم هو النوع B الذي يعد أخطر أنواع السموم الفطرية وبالإضافة إلى النوع السابق هناك أنواعاً أخرى مثل Aflatoxical و B2, G1, G2 , M1,M2, و Q1,P1 وغير ذلك

تظهر أنواع المجموعة . B باللون الأزرق المضيئ عند أشعة الـ UV فيما تظهر المجموعة G باللون الأخضر المضيئ تحت نفس الأشعة(شكل2)

ومن الممكن إنتاج سموم الأفلا من الفطرين السابقين بتوفر الأوساط الغذائية الملائمة للنمو وإنتاج السموم إضافة إلى توفير درجة حرارة التحضين المناسبة 30-28 م° والـ PH الذي يفضل أن يكون عند 5.5



**مواد العمل :-**

مزرعة لأحدى الفطرين أعلاه , بيئة PDA معقمة , قناني زجاجية معقمة سعة 100 مل , ماصات معقمة مختلفة الأحجام , أنابيب إختبار تحتوي كل منها 10 مل ماء معقم ومواد مختبرية أخرى وأجهزة .

**طريقة العمل:-**

1. تحضير المعلق السبوري للفطر وتتم كالاتي : .
  - (a) تنمية أحد أو كلا الفطرين على بيئة PDA في قنينة زجاجية (على صورة PDA Slaut) وذلك بالتلقيح من مزرعة الفطر بواسطة loop معقم .
  - (b) التحضين بدرجة حرارة 28 م° لمدة 5-7 أيام .
  - (c) إضافة 10مل ماء مقطر معقم إلى مزرعة الفطر وقشط سبورات الفطر بواسطة loop معقم وجمع هذه السبورات .

**2. تحضير وسط زرع للفطر Synthetic media يتكون من:-**

6غم  $(NH_4)_2 SO_4$  و 5غم  $KH_2PO_4$  و 6.4غم  $K_2HPO_4$  و 0.5غم  $HCL$  و 0.5غم  $MgSO_4.7H_2O$  و 2غم  $glycine$  و 2غم  $glutamic acid$  و 10غم  $FeSO_4.7H_2O$  و 5غم  $ZnSO_4.7H_2O$  و 5غم  $MnSO_4$  و 1غم  $H_2O$  . إذ يتم إذابة هذه المكونات في دورق زجاجي سعة 1لتر وذلك باستخدام 900مل من الماء المقطر ويضبط الـ PH عند 5.5, فيما يتم إذابة 50غم من الـ  $glucose$  في 100مل ماء مقطر . يوزع الوسط التركيبي على دوارق زجاجية سعة 250 مل وبواقع 23مل / دورق وتعقم لوحدها فيما يعقم الكلوكوز لوحده , وبعد التعقيم يتم إضافة 2مل كلوكوز معقم (بماسة معقمة ) إلى الوسط ليصبح 25مل/دورق ويلقح ب1مل من سبورات الفطر ويرج ثم يحضن على 28م° لمدة 7 أيام .





Aflatoxin toxins



شكل 2