

طرق تقدير العدد البكتيري

توجد عدة طرق يتم بواسطتها تقدير الاعداد البكتيرية في عينات الأغذية او المياه واهم هذه الطرق هي :

1. العد بالأطباق القياسية (Standard Plate Count) ويعبر عنها بختصر (SPC) وتعرف بطريقة العد غير المباشر .

2. العد المباشر بالمايكروскоп (Direct Microscope Count) ويعبر عنها بختصر (DMC) .

3. العد الأكثر احتمالاً (Most Probable Number) ويعبر عنها بختصر . (MPN)

أولاً: العد بطريقة الأطباق القياسية (SPC)

تعتبر هذه الطريقة أكثر الطرق شيوعاً والمعتمدة لتقدير الأعداد البكتيرية الحية الهوائية والاختيارية في الأغذية وقد وجدت مقاييس وضوابط الحد الأعلى والأدنى للأعداد البكتيرية التي بواسطتها يمكن رفض لو قبول الغذاء وتخالف هذه الضوابط والمقاييس باختلاف البلد والمؤسسات وهي تعد من الطرق غير المباشرة اهم ما تمتاز به هذه الطريقة :

1. تعدد الأحياء المجهرية الحية فقط

2. يمكن معرفة البكتيريا والفطريات في نفس الوقت .

اما اهم عيوب هذه الطريقة :

1. تستغرق وقت طويل .

2. تتطلب مستلزمات عمل كثيرة .

3. احتساب المستعمرات الكبيرة والصغيرة (المندمجة مع بعضها على انها مستعمرة واحدة).

4. هناك أنواع من الأحياء قد لا تنمو في الوسط الغذائي المستخدم او قد لا تنمو ضمن درجة الحرارة المستخدمة ، وبعضها يكون لاهوائي Anaerobic لذلك لا تحسن هذه الأنواع الا اذا سمحت لها الظروف بالنمو.

تساعد عملية تعداد البكتيريا في تقدير نوعية الأغذية المستخدمة ، وقد جرت العادة على عد البكتيريا من خلال المستعمرات التي تكونها في الأطباق التي تحتوي على الأوساط الزرعية وكما هو شائع يطلق اسم بكتيريا على هذه الاعداد ويكتب (بكتيريا / غم) ولكن تم تصحيح ذلك

بوضع اسم وحدة مكونة المستعمرات ويعبر عنها ب (CFU) (Colony Forming Unit)

لاحتمال تكون مستعمرة واحدة لاكثر من خلية بكتيرية .

وتتلخص خطوات العمل فيها بما يلي:

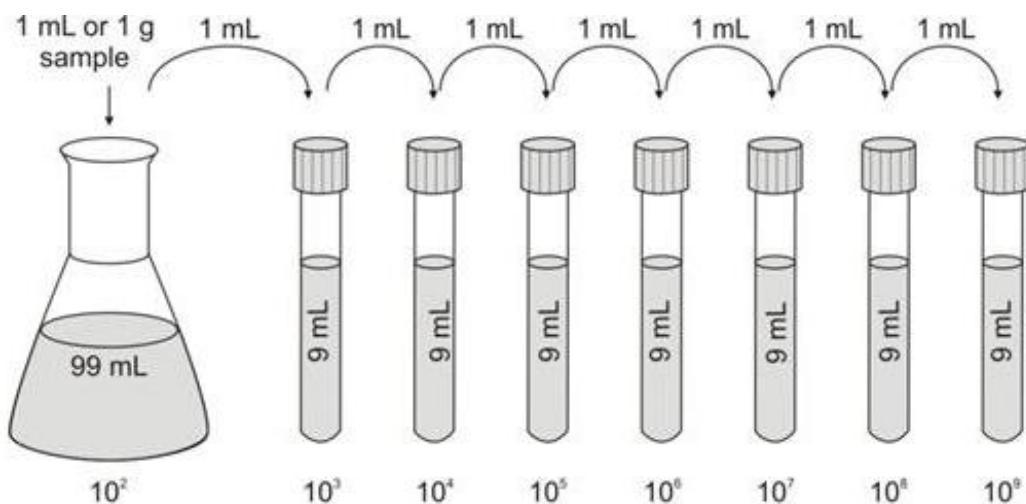
تحضر سلسلة من التخافيف العشرية Preparation of serial decimal dilution

وذلك بأتبع الخطوات التالية:

1-يضاف 11 غم او (مل) من العينة (تربيه، ماء ، حليب ، ..) إلى قنينة التخافيف الأولى الحاوية على 99 مل من ماء البيتون Peptone water (يحضر باذابة 0.1 غم من Peptone في 100 مل من الماء المقطر) ترج القنينة رجاً قوياً للحصول على مزيج متجانس.

2-ينقل 1 مل من محلول القنينة الأولى وبواسطة ماصة معقمة (تحت ظروف معقمة) إلى قنينة التخافيف الثانية والحاوية أيضا على 9 مل من ماء البيتون وترج القنينة رجاً جيداً.

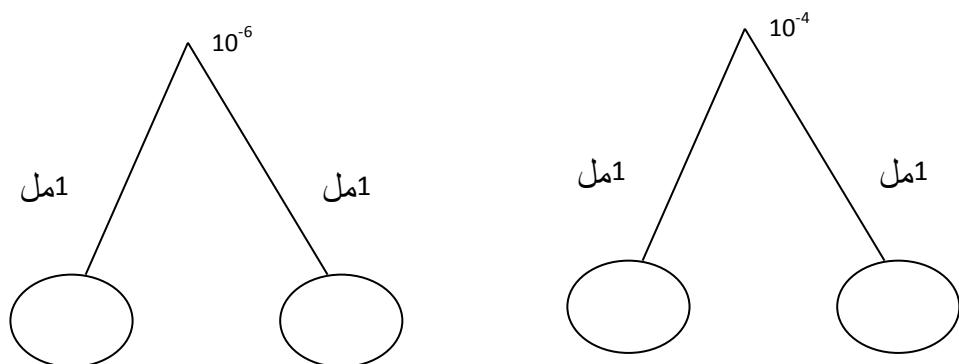
3-تكمل بقية التخافيف بنفس الطريقة لحين الوصول إلى التخافيف المناسب وكما هو موضح أدناه:



تم طريقة العد بطريقة الأطباق القياسية Standard Plate Count (SPC) بطريقتين :

أً: صب الأطباق Plate pouring

1- يؤخذ 1 ملليلتر من التخافيف الأخيرة على اعتبار إن التخافيف الأولى تحتوي على أعداد كبيرة من الأحياء المجهرية يصعب عدها ، لذلك نفرض إننا نقلنا 1 ملليلتر من التخافيف 10^{-4} إلى طبق بتري معقم ونعمل له مكرر أي نأخذ 1 ملليلتر من نفس التخافيف ووضعه في طبق بتري آخر ، تكرر العملية نفسها على التخافيف 10^{-6} وكما موضح:



- يستخدم في عملية النقل ماصة معقمة وتنتمي العملية تحت ظروف معقمة.

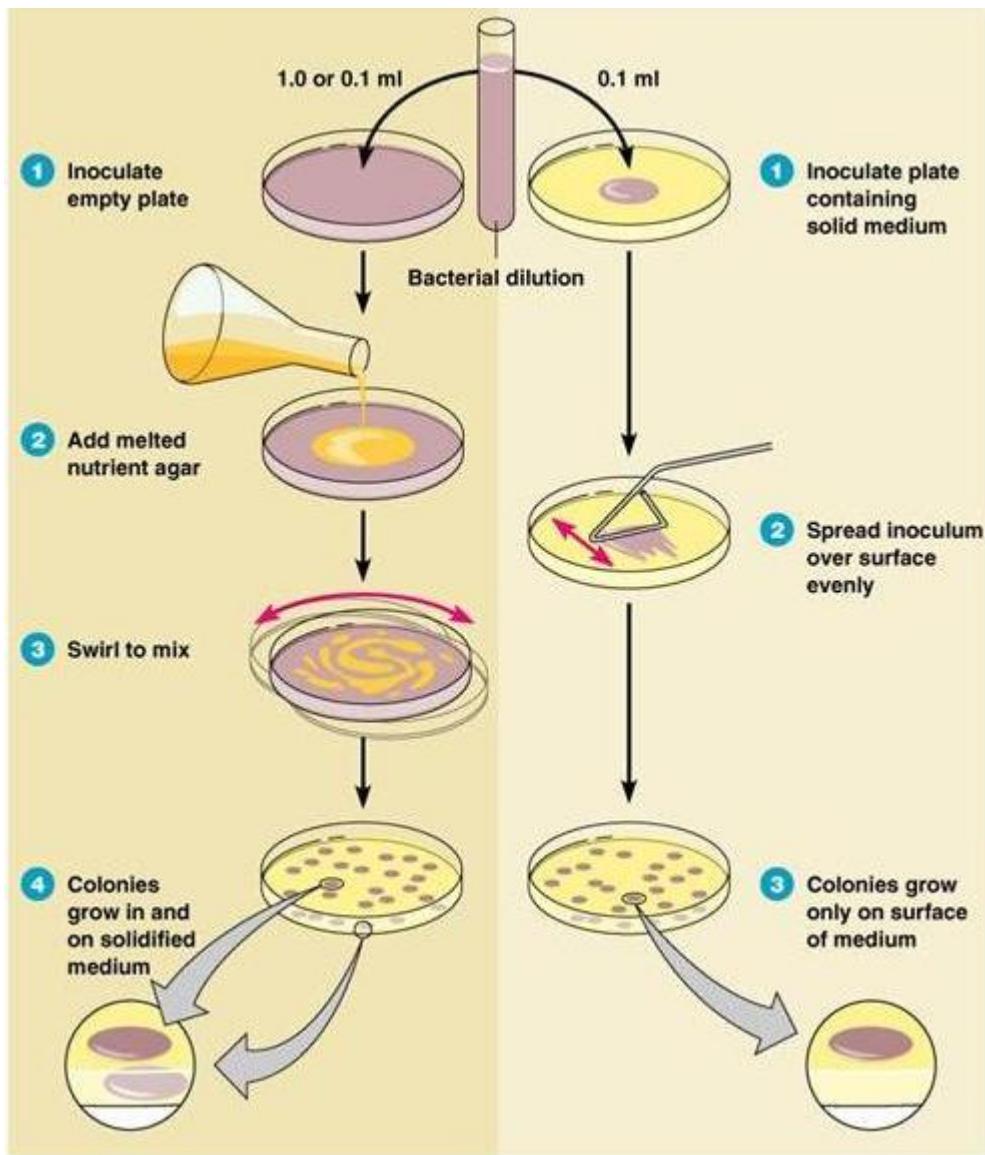
2- يضاف إلى كل طبق من الأطباق الأربع الوسط الغذائي Nutrient Agar بمقدار 15-20 ملليلتر في كل طبق وتدور الأطباق يميناً ويساراً أي بحركة دائيرية باتجاه عقرب الساعة وبعكسه لخمس مرات لغرض مزج العينة مع الوسط داخل الأطباق ، يصب الوسط إلى الأطباق وهو بدرجة حرارة 45°C تقريباً في ظروف معقمة .

3- تترك الأطباق إلى أن يتصلب الوسط ثم توضع في الحاضنة بصورة مقلوبة بدرجة حرارة 35-37°C لمدة 48 ساعة.

ب: طريقة النشر السطحي Surface or spread plating

تستخدم في بعض الدراسات مثل عد البكتيريا *S.aureus* على الوسط الزراعي المتصلب Mannitol salt agar حيث يحضر مسبقاً ويجفف سطحه جيداً بواسطة وضع الأطباق بعد صب الوسط فيها في حاضنة بدرجة حرارة 37°C لمدة ليلة. ثم ينقل مقدار 0.1 مل من التخافيف الغذائي أو البكتيري المطلوب (لا ينصح بإستخدام كمية أكثر بسبب صعوبة جفافها على سطح الوسط الزراعي) ثم ينشر على سطح الوسط بواسطة قضيب زجاجي ملتوى معقم

يشبه الحرف L الكبير. ويمكن استخدام نفس القصيب الزجاجي لعدة تخفيف يبدأ التشر من التخريف الأعلى نحو التخريف الأقل.



ثالثاً: حسابات الطريقة:

تؤخذ الأطباق التي تتراوح فيها عدد المستعمرات من 30-300 مستعمرة بعين الاعتبار مع إهمال الأطباق التي تزيد فيها عدد المستعمرات عن 300 أو يقل فيها عدد المستعمرات عن 30 ، لأن زيادة المستعمرات عن 300 يعني احتمال حصول تنافس بين الأحياء المجهرية وعدم نمو الأحياء المجهرية الضعيفة غير قادرة على التنافس على المواد الغذائية في الأطباق ، أما ما قل عن 30 فإنه لا يمثل الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية في العينة .

يطبق القانون التالي لإيجاد عدد البكتيريا أو الأحياء المجهرية في العينة:

$$\frac{\text{معدل عدد المستعمرات} \times \text{مقلوب التخفيض}}{\text{حجم او وزن العينة}}$$

مثال :

إذا فرضنا أن أعداد المستعمرات في مكررات الأطباق كانت 20 و 23 للتخفيض الرابع فإن النتيجة تكون :

$$\frac{10000 \times 43}{1} = \frac{\text{معدل عدد المستعمرات} \times \text{مقلوب التخفيض}}{\text{حجم او وزن العينة}}$$

430000 خلية/مل أو غم إذا كانت العينة الممزروعة هي 1 مل . أما إذا كانت 0.1 مل فيضرب الناتج في 10.

المصادر :

الدليمي،خلف صوفي داود. (1988) .كتاب علم الاحياء المجهرية الجزء العملي.

رقم التسجيل 168991 :

رقم التسجيل 168992 :

رقم التصنيف 576.163 :

رقم المؤلف : د 745

مكان النشر والناشر : بغداد:جامعة بغداد

عدد الصفحات: 264 ص