التقدير الكمي للنمو البكتيري

من الضروري أحياناً للباحث أن يعرف عدد الخلايا في عينة ما، كأن يكون عدد البكتريا الموجودة في نموذج مثل (1سم^3) من الحليب أو ماء الشرب أو مستحضر تجاري ... الخ.

أولاً: الطرائق المباشرة Direct Methods

1. طريقة بريد Breed count
2. شريحة العد Haemocytometer (counting chamber)
3. انابيب ماكفرلاند McFarland
4. درجة التعكر Turbidity

ثانياً: الطرائق غير المباشرة Indirect Methods

1. طريقة العد بالأطباق Plate count
2. الوزن الجاف Dry weight
3. طريقة الترشيح Filtration

عد البكتريا باستخدام شريحة العد

وهي طريقة سريعة للتعداد المباشر لخلايا البكتريا وتستخدم فيها شريحة خاصة تفحص تحت المجهر الضوئي. يمكن حساب العدد الكلي للبكتريا المعلقة في سائل ما، وذلك بوضع العالق على الشريحة. إن عمق السائل بين الغطاء والشريحة هو (0.1 ملم). أما سطح الشريحة فهو مقسم إلى مربعات صغيرة ثم أصغر فأصغر. وإن أصغر مربع تبلغ مساحته (400/1) ملم^2، أي أنه في المليمتر المربع الواحد هناك 400 مربع صغير.

طريقة العمل:

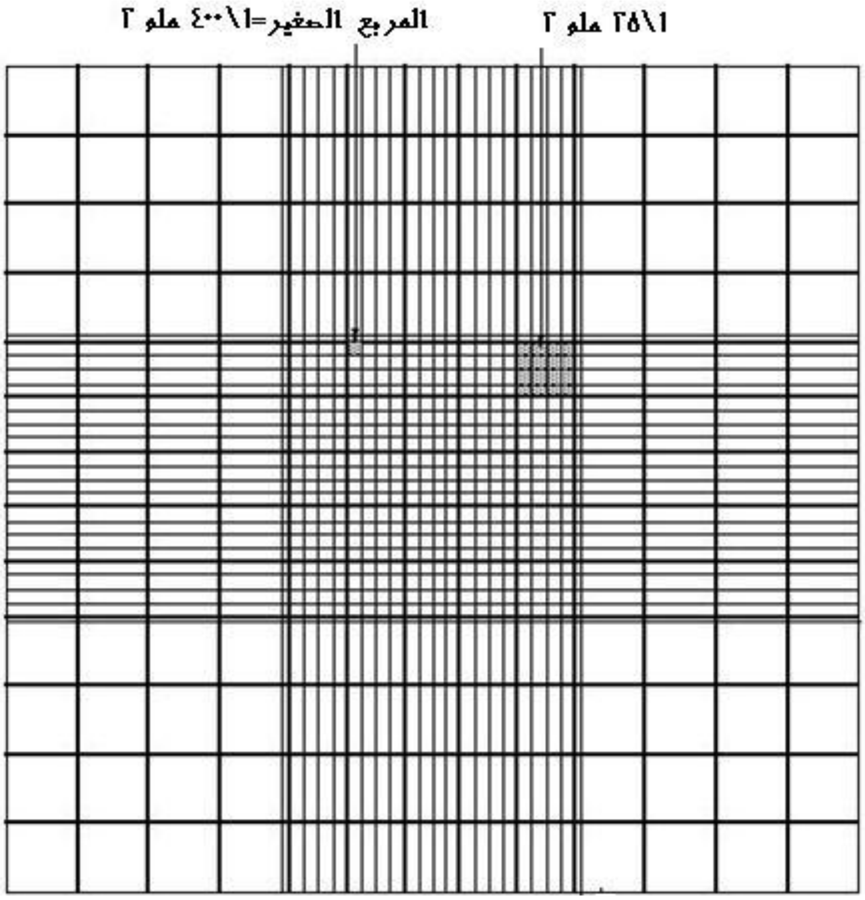
1. يخفف عالق البكتريا بتخافيف عشرية ويتم اختيار التخفيف الذي يبدو قليل التضبب.

2. غسل شريحة العد غطاء الشريحة والتجفيف بقطعة قماش نظيفة.

3. وضع الغطاء فوق الشريحة.

4. رج أنبوبة العالق لمجانسته ثم نقل قطرة من العالق باستخدام ماصة باستور أو قطارة أو سرنجة.

5. وضع فتحة الماصة بحذر لتلامس حافة الغطاء الملامس لحافة الشريحة لتدخل القطرة بالخاصية الشعرية. في هذه الخطوة سيدخل حجم (0.1 ملم^3) من العالق ليتوزع تلقائياً على المربعات في الشريحة.



الحسابات

توضع الشريحة تحت قوة التكبير الصغرى ونبدأ بالعد. لنفترض أن عدد الخلايا التي تم حسابها في 100 مربع صغير كان 500 خلية، فهذا يعني أن عدد الخلايا في المربع ذي المساحة (1 ملم^2) (والذي يحوي على 400 مربع صغير) سوف يكون: 500 × 4 = 2000 خلية.

وبما أن هناك عمقاً في الشريحة (قدره 0.1 ملم)، لذلك يجب حساب العدد في وحدة حجم وليس وحدة مساحة:

الحجم = المساحة × العمق

= 1 ملم^2 × 0.1 ملم

= 0.1 ملم^3

أي أن العدد (2000) تم حسابه لـ 0.1 ملم^3 من العينة.

إذن: عدد البكتريا في الملمتر المكعب للعينة الأصلية هو:

2000 × 10 = 20000 خلية/ ملم^3

وبما أن 1000 ملم^3 = 1 سم^3 (مللتر)، فلكي نحول الملمتر المكعب إلى السنتمتر المكعب يجب ضرب العدد × 1000 ليصبح العدد الكلي للبكتريا في كل 1 مل (سم^3) من العينة الأصلية هو: 20000 × 1000 = 20000000 خلية/ مل.

أما إذا كان العالق مخففاً فيضرب الرقم الأخير في معكوس التخفيف.

وبذلك يصبح قانون حساب الخلايا بهذه الطريقة:

عدد البكتريا/ 1سم^3 من العينة الاصلية = معدل عدد الخلايا في المربع الواحد الصغير × معامل الشريحة (4 × 10^6) × معكوس التخفيف (إن وجد)

يجب الإشارة إلى أن عالق البكتريا عند إدخاله في الشريحة المقسمة فقد تستقر بعض الخلايا على الحدود ما بين المربعات مما قد يؤدي إلى تعدادها مرتين، وبالتالي قد يؤثر ذلك على العدد الكلي. ولتلافي هذا الخطأ يتم حساب الخلايا على الحدود العليا واليمني وتهمل الخلايا على الحدود السفلى واليسرى. كما أن طريقة العد بالشريحة لعد البكتريا في المواد الصلبة.

التعداد الحي Viable Count (Plate Count)

في العد المباشر يتم تعداد الخلايا الحية والميتة ولكن في معظم الحالات يهمنا أن نعرف أعداد الخلايا الحية. والخلية الحية هي التي تستطيع أن تنمو وتتكاثر لتكون المستعمرات. تعتمد طريقة العد بالأطباق Plate Count على أساس أن كل خلية حية توضع في وسط مغذي صلب وتحت ظروف مناسبة تنمو وتتضاعف لتعطي مستعمرة. وبذلك فإن عدد المستعمرات التي تظهر على الطبق بعد الحضن يمثل عدد الخلايا الحية في العالق أو العينة الأصلية.

هناك طريقتان لهذا النوع من العد:

1. طريقة النشر في الطبق Spread Plate Method
2. طريقة الصب في الطبق Pour Plate Method

في الطريقة الأولى ينشر 0.1 مل من التخفيف المناسب في الطبق الحاوي على الوسط الزرعي باستخدام ناشر زجاجي معقم، ثم يحضن الطبق لحين ظهور المستعمرات وعدها. أما في طريقة صب الأطباق فينقل حجم معين (0.1 – 1 سم^3) إلى طبق فارغ معقم، ثم يصب الوسط ويمزج جيداً بتدويره على شكل رقم (8) ثم يترك الطبق ليبرد ويتصلب الوسط، ثم يحضن في الحاضنة لحين ظهور المستعمرات، وعد الأطباق التي تظهر فيها 30–300 مستعمرة. حيث يتم إهمال الأطباق التي تظهر فيها أقل من 30 مستعمرة لأسباب إحصائية، أما الأطباق التي تظهر فيها أكثر من 300 مستعمرة فيتم إهمالها لأنها صعبة التعداد لتزاحمها.

من مميزات هذه الطريقة أنها تعطي تقديراً دقيقاً للأعداد الحية فقط، أما مساوئها فتتضمن عدم وجود وسط مغذي لكل أنواع البكتريا، كما أن الفترة الزمنية لها تأثير على أعداد البكتريا، فضلاً عن أن بعض المستعمرات قد تكون صغيرة تصعب رؤيتها بالعين المجردة.

نظراً لصعوبة عد أكثر من 300 مستعمرة في الطبق الواحد لذلك فإنه من الضروري جداً إجراء تخافيف عشرية ($\frac{1}{10}$، $\frac{1}{100}$، ....) للعينة التي يتوقع فيها أعداد عالية من البكتريا، حيث

يمكن إجراء التخفيف الأول بإضافة 1 مل من العينة الأصلية إلى 9 مل من المذيب، وإجراء التخفيف الثاني بإضافة 1 مل من التخفيف الأول إلى 9 مل من المذيب.

إن ما يتم عده من المستعمرات يعبر عنه بـ Colony Forming Unit (CFU) لكل سم^3 بدلاً من خلية/ سم^3، بسبب إمكانية اندماج خليتين أو أكثر (وهي حالة طبيعية في بعض أنواع البكتريا مثل المسبحيات) لتعطي مستمرة واحدة.

طريقة العمل:

1. نقل 1 مل (سم^3) من العينة المراد حساب عدد البكتريا فيها إلى أنبوبة تحتوي على (9) مل من المحلول المخفف. ثم رج الأنبوبة لمجانسة العالق، حيث يكون مقدار التخفيف في هذه الأنبوبة هو $\frac{1}{10}$ أو (10^{-1}).
2. نقل 1 مل من التخفيف الأول إلى أنبوبة أخرى تحتوي على 9 مل مال المحلول المخفف، وبذلك يكون مقدار التخفيف في الأنبوبة الثانية $\frac{1}{100}$، وهكذا إلى أن نصل إلى التخفيف المطلوب حسب عكورة المزرعة الأصلية.
3. بعد تحضير التخافيف يتم العمل بإحدى الطريقتين:

أ. طريقة النشر في الطبق: بعد صب الوسط الزرعي في الأطباق وتصلبه ينقل 1 مل من التخفيف الأخير إلى الطبق. ثم ينشر هذا العالق بواسطة الناشر الزجاجي بعد تعقيمه بالتلهيب الكحولي وتبريده. يترك الطبق بعدها مدة خمس دقائق ثم يحضن بصورة مقلوبة في الحاضنة لمدة (24–48) ساعة، وتحسب المستعمرات بعد الحضن.

ب. طريقة الصب في الأطباق: ينقل (0.1–0.2 مل) من التخفيف المطلوب إلى طبق بتري فارغ معقم. ثم يبرد الوسط الزرعي وهو في الدورق إلى درجة حرارة 40°م ويصب في الطبق الحاوي على العالق البكتيري، ثم يدور الطبق على شكل رقم (8) ويترك إلى أن يتصلب ثم يحضن في الحاضنة لمدة (24–48) ساعة، وتحسب المستعمرات بعد

الحضن، ليكون عدد وحدات تكوين المستعمرة في 1 سم^3 من العينة حسب القانون التالي:

عدد CFU/ 1سم^3 من العينة الاصلية = عدد المستعمرات × معكوس التخفيف × 10 (في حالة نقل 0.1 سم^3)