المحاضرة3

تقدير العدد البكتيري :

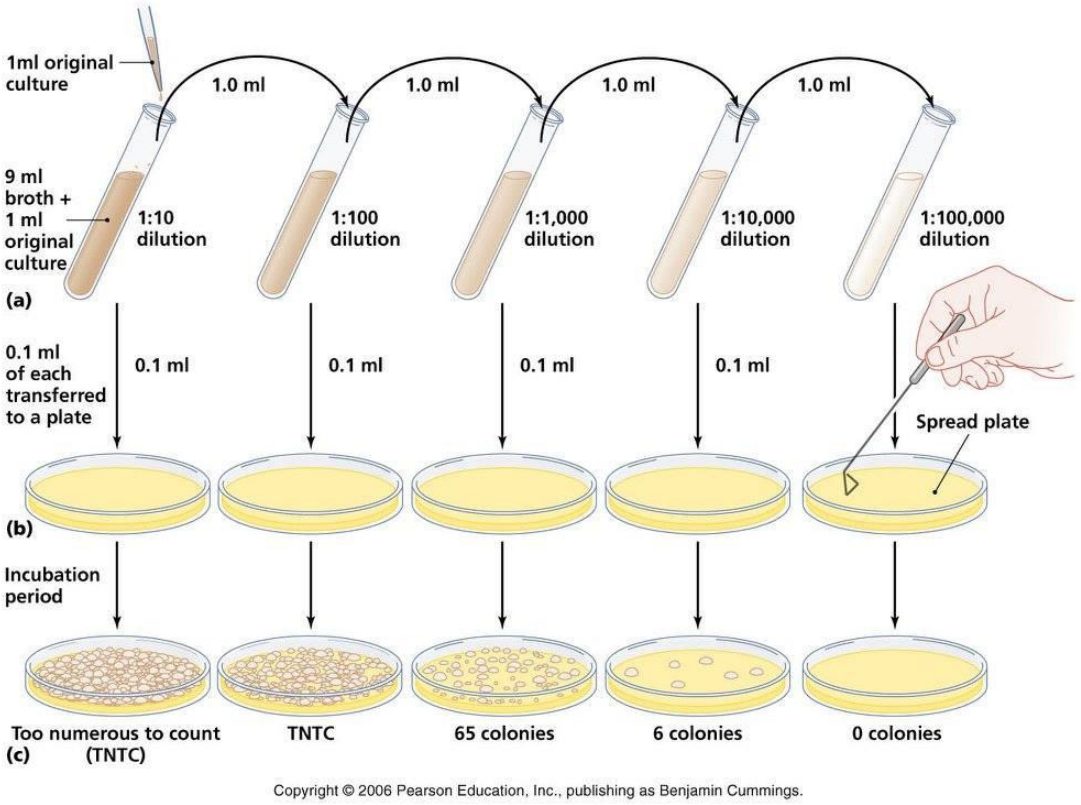
يوجد عدة طرق يمكن بواسطتها تقدير الأعداد البكتيرية في عينات الأغذية او المياه واهم الطرق هي:

اولا: العد بواسطة الأطباق : Plate Counts : وتشمل طريقة الصب Pour Plate وطريقة النشر Spread Plating .

ثانيا: العد الأكثر احتمالا: Most Probable Number(MPN)

ثالثا: العد المباشر بالمجهر: Direct Microscopic Count (DMC)

اولا : العد بواسطة الأطباق : Plate Counts : وتعتبر من اكثر الطرق شيوعا والمعتمدة لتقدير الأعداد البكتيرية الحية الهوائية والاختيارية في الأغذية . وقد وضعت ضوابط ومقاييس للحد الأعلى والأدنى للأعداد البكتيرية التي بواسطتها يمكن رفض او قبول الأغذية وتختلف الضوابط والمقاييس بأختلاف البلدان . لاحظ الشكل 1 يبين طريقة التخفيف والزرع بالأطباق.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

شكل رقم (1)

تحضير العينة وأجراء التخافيف :

من المهم اخذ عينة ممثلة تمثيلا جيدا للأغذية المراد فحصها مايكروبيا وكلما كان عدد المايكروبات اقل او توزيعها غير منسجم كلما تطلب الأمر عينات اكبر للفحص . ومن الامثلة.

1- اللحوم : يوزن 11 غم ويضاف الى 99 مل محلول تخفيف معقم هو محلول buffer phosphate أو 0.1 % ببتون في ماء مقطر معقم ويهرس في خلاط لمدة دقيقتين ثم تجرى التخافيف اللازمة ويقترح ان تكون التخافيف للحوم مابين 10^{-1} – 10^{-4} وللحوم المفرومة 10^{-5} – 10^{-7} .

2- منتجات البيض: يوزن 11 غم ويضاف الى 99 مل محلول التخفيف المعقم (0.85% كلوريد الصوديوم) ويمزج الخليط جيدا وتحضر التخافيف اللازمة وتكون بين 10^{-2} – 10^{-4}

3- الطحين: يوزن 11 غم ويضاف الى 99 مل من الماء المقطر المعقم المحتوي على رمل معقم يمزج لمدة دقيقتين ثم تجرى التخافيف 10^{-1}- 10^{-3} .

4- الثمار الجافة : يوزن مقدار 50 غم وتضاف الى 450 مل ماء مقطر معقم (تخفيف 10/1) يترك لمدة دقيقتين ثم تجرى التخافيف 10^{-2} – 10^{-4} .

5- اللهانة : يون 50 غم ويضاف الى 450 مل ماء مقطر معقم (تخفيف 10/1) وتهرس بالخلاط لمدة دقيقتين ثم تجرى التخافيف 10^{-5} – 10^{-6} . وطريقتا العد بالأطباق هما.

أ – طريقة الصب بالأطباق : Pour Plate :

يوضع مقدار 1مل من التخفيف الملائم للغذاء قيد الدرس ثم يصب الوسط الزرعي plate count agar ثم تحضن الأطباق بدرجة 30- 33 ْم لمدة 2-3 يوم وتسجل النتائج .

عد الأطباق : تعد الأطباق التي فيها عدد مستعمرات يتراوح بين 30 -300 مستعمرة (معدل طبقين) للتخفيف الملائم بواسطة جهاز عد المستعمرات Quebec او غيره .

تقديم النتائج : تقدم النتائج بعدد البكتريا لكل غم او مل غذاء بواسطة ضرب مقلوب التخفيف في معدل المستعمرات لطبقين على الأقل .

فلو فرضنا ان معدل عدد المستعمرات في طبقين لأعلى تخفيف استخدم (10^{-4}) كان 43 مستعمرة فتكون النتيجة :

$$\frac{43*10000}{1} = \frac{\text{معدل عدد المستعمرات} * \text{مقلوب التخفيف}}{\text{حجم او وزن}}$$ يعني 430000 عدد البكتريا لكل 1مل حليب او غذاء عندما تكون العينة المزروعة 1مل وعندما تكون 0.1 مل فيضرب الناتج في 10 .

ب- طريقة النشر السطحي : Spread plating

تستخدم في بعض الدراسات كعد بكتريا Staph.aureus على الوسط الزرعي المتصلب Mannitol salt agar أو Tellurite glycene agar حيث يحضر مسبقا ويجفف سطحه جيدا بواسطة الاطباق بعد صب الوسط فيها بدرجة 37 ْم لفترة ليلة .ثم ينقل مقدار 0.1 مل من التخفيف الغذائي او البكتيري المطلوب (لاينصح باستخدام كمية اكبر بسبب صعوبة جفافها على سطح الوسط الزرعي) ثم ينشر على سطح الوسط بواسطة قضيب زجاجي ملتوي معقم يشبه حرف **L** الكبير . ويمكن استخدام نفس القضيب لعدة تخافيف بشرط يبدأ النشر من التخفيف الأعلى تحو الأقل . وبعد الحضن تعد البكتريا بالغرام او السنتمترالمربع الواحد .

ثانيا: طريقة العد الأكثر احتمالا Most Probable Numbers (MPN) :

كما في الطريقة السابقة يجب تحضير تخافيف عشرية وحتى التخفيف الذي ينعدم فيه تواجد البكتريا. ثم ينقل 1 مل أو 0.1 مل من كل تخفيف الى انابيب تحوي وسط النمو الزرعي المناسب وتوجد جداول مقابل عدد الأنابيب التي تستخدم لأستخراج القيم منها فمنها جداول ذات 3 أو 5 أو 8 أو 10 أنابيب ، وكلما زاد تكرار الأنابيب كلما كانت النتائج أكثر دقة .

ثالثا: العد المجهري المباشر : Direct Microscopical Count (DMC) :

تستخدم طريقة العد المجهري المباشر للأغذية السائلة خاصة الحليب وهي تختلف عن الطرق السابقة بأنها تعد كافة البكتريا الحية والميتة بعكس الطرق السابقة التي تعد البكتريا الحية فقط.

طريقة العمل:

ينظم ويعرف الحقل المجهري بالضبط اولا ثم ينقل مقدار 0.01 مل من الغذاء او الحليب السائل على سطح شريحة زجاجية خاصة نظيفة وينشر بمساحة سنتمتر مربع (100ملم^2) ثم يسمح للسائل ان يجف . ويثبت الغشاء بالحرارة ويصبغ بالمثيلين الازرق . يحسب معدل العدد البكتيري او عدد الأكوام Clump لكل حقل مايكروسكوبي بعد عد 10-60 حقل .

طريقة العد :

يمكن عد البكتريا باستخدام المجهرواستخدام شريحة عد خاصة مثل Petroff Hausser مقسمة الى مربعات بدقة ومساحة المربع $\frac{1}{400}$ ملم^2 تغطى بشريحة زجاجية ترتفع عن شريحة العد بمقدار $\frac{1}{50}$ ملم^2 حيث توضع قطرة من تخفيف البكتريا الملائم والمعلوم على شريحة العد وتغطى بشريحة الغطاء COVER SLIP تعد البكتريا لكل مربع ويؤخذ معدل عدد المربعات لايقل عن 20 مربع . يقدر العدد المجدري المباشر في 1سم^2 بحساب عدد البكتريا او التجمعات في عدد من الحقول الميكروسكوبية الصغيرة ويحسب معدا الخلايا بكل حقل صغير ويضرب بالعامل المجهري Microscopic Factor(MF) .ويجب اختيار الحقول الصغيرة للعد.