

الدرس العملي السادس

طرق تقدير النمو البكتيري

Estimating methods of bacterial growth

د / نجلاء محمد سيد

د/ رأفت خلف الله

هيثم حمدى تميم

نهى ثابت

تقدير النمو البكتيري

□ يقدر النمو البكتيري كميًا بعدة طرق، و سنشير الى الفكرة الأساسية و مميزات بعض الطرق المستعملة.

1 - العد المباشر بالميكروسكوب: Direct microscopic count

تعتبر هذه الطريقة من الطرق المباشرة، و التي تعطى العدد الكلى للبكتريا مباشرة بما في ذلك الحى و الميت، و تمتاز هذه الطريقة بأنها من الطرق السريعة و لكن يعاب عليها أنها لا يمكن التمييز بين البكتريا الحية و الميتة فى الشريحة كما أنه يصعب التمييز بين مكونات البيئة و الميكروبات فى بعض الأحيان و من الصعب استخدامها لعد البكتريا النامية فى بيئات صلبة لتكتل البكتريا و صعوبة فرزها، كما أنه عند استعمال بيئات تحتوى على أعداد كثيفة أو خفيفة من الميكروبات فإنه يلزم عمل تخفيفات أو تركيزات مناسبة هذا بالإضافة الى أن الطريقة اذا استخدمت بدقة و باستمرار تكون مجهدة للنظر.

و من الطرق الميكروسكوبية المباشرة:

أ- طريقة شريحة بريد. Bread smear

ب- غرفة العد. Counting chamber

2- التقدير الغير مباشر العد بطريقة الأطباق Plate count :

هذه الطريقة من الطرق غير المباشرة لاجراء العد البكتيرى و فيها يقدر عدد البكتريا الحى فقط، أى القادر على التكاثر، و لكن يعاب عليها أنها تحتاج لوقت طويل و الى أوات و أجهزة كما انها تعطى عدد أقل من العدد الحقيقى اذ أن البيئة المستخدمة و ظروف التحضين و النمو لا تناسب كل أنواع البكتريا الموجودة بالعينة الجارى دراستها، هذا بالاضافة الى أن المستعمرات المتكونة من ميكروب واحد أو من سلسلة أو من كتلة من الميكروبات، و تستعمل هذه الطريقة بكثرة لتقدير عدد البكتريا فى المياه و اللبن و الأغذية و التربة و غيرها.

طريقة العمل:

١. لديك مزرعة بكتيرية نامية على مرق مغذي، ترج المزرعة جيدا
٢. بواسطة ماصة معقمة، ينقل ١ مل من المزرعة الى انبوبة تحتوي على ٩ مل ماء معقم وترج الأنبوبة (تخفيف ١:١٠)
٣. ينقل من الأنبوبة السابقة ١ مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى انبوبة بها ٩ مل ماء معقم وترج الأنبوبة (تخفيف ١:١٠٠)
٤. تكرر الخطوة السابقة عدة مرات للحصول على تخفيفات تصل الى ١: ١٠٠٠٠٠٠
٥. ينقل ١ مل من التخفيفات الثلاثة الأخيرة الى طبق بتري معقم (طبقين لكل تخفيف)
٦. لكل طبق يضاف كمية مناسبة من وسط الاجار المغذي المسالة والمبردة الى ٤٥ م ويحرك الطبق
٧. تترك الاطباق حتى يتصلب الوسط ثم توضع مقلوبة في الحضان عند ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة
٨. يتم اختيار التخفيف المناسب الذي يظهر به عدد المستعمرات يتراوح بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة بالطبق الواحد

٩. يحسب عدد الخلايا الحية في ١ مل من المزرعة الاصلية بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل

٣- استخدام القياسات البصرية:

□ و هذه من الطرق غير المباشرة لتقدير النمو، و تعتبر من الطرق الكثيرة الاستعمال لسرعتها و دقتها الا أنها يعاب عليها أنها تقدر الخلايا الحية و الميتة معا و لا يمكن استعمالها في حالة المواد الملونة بعمق كبير أو التي تحتوى على مواد أخرى عالقة غير الخلايا البكتيرية.

٣- استخدام القياسات البصرية:

□ و من الطرق المستخدمة طريقة الألوان Colorimetric و طريقة الاسبكتروفوتوميتر Spectrophotometric و طرق تقدير درجة التعكير Turbidimetric و الأساس في هذه الطرق، أنه عندما يمر شعاع ضوئي في معلق بكتيري فان جزء منه يمتص بواسطة المعلق، و بذلك فان كمية الأشعة النافذة من المعلق Transmitted تتناسب عكسيا مع كثافة هذا المعلق، اي كلما زاد تعكير البيئة نتيجة زيادة النمو كلما قلت قراءة الجهاز، بمعنى أن القراءة تكون متناسبة عكسيا مع عدد الخلايا.

٣- استخدام القياسات البصرية:

□ و يقاس الضوء النافذ باستعمال وحدة ضوئية حساسة Photometric cell فى جهاز مناسب مثل جهاز Turbidimeter, Colorimeter, Spectrophotometer مع استعمال مرشحات ضوئية مناسبة بحيث يستعمل منها ما يمكن للمعلق البكتيرى أن يمتص أكبر كمية من الضوء النافذ، و تقدر درجة التعكير على موجة طولها ٤٢٠ نانوميتر للمعلقات غير الملونة، و للمعلقات ذات اللون الأصفر أو الذى يميل الى البنى تستعمل موجة طولها ٦٠٠ ملليمكرون و هكذا تقيم النتائج المتحصل عليها بطرق العد الأخرى المعروفة. و لسرعة اسخلاص النتائج تعمل منحنيات قياسية Standard curves تربط بين القراءات المأخوذة و البيانات الأخرى المطلوبة مثل عدد الخلايا، الوزن الجاف، المحتوى النيتروجينى... الخ.