

الدرس العملي الثامن

تابع طرق عد البكتيريا في اللبن
ومنتجاته

أهداف الدرس

- التعرف بطرق الرقم الأكثر احتمالاً والعد المجهرى المباشر المستخدمة فى تقدير العدد البكتيرى الكلى فى اللبن ومنتجاته.
- التعرف بالطرق غير المباشرة لتقدير العدد البكتيرى الكلى فى اللبن ومنتجاته.
- المقارنة بين مميزات وعيوب الطرق المختلفة لعد البكتريا فى اللبن ومنتجاته.
- التدريب على طريقة العد المجهرى المباشر.

العد بطريقة الرقم الأكثر احتمالاً

Most probable number (MPN) method

- تستخدم هذه الطريقة في تقدير الأعداد المنخفضة من الميكروبات التي قد تصل إلي ١٠ وحدة تكوين مستعمرة بالجرام أو المللي غذاء، حيث أن مثل هذه الأعداد يكون من الصعب تقديرها باستخدام العد علي الأطباق خاصة في حالة عينات الجبن أو المنتجات الصلبة الأخرى والتي تحتاج إلي تخفيفها بإضافة محلول ملحي أو بيئة MRD حتى يمكن تحليلها، وهذا يؤدي إلي تقليل عدد الميكروبات ويجعل من الصعب تقديرها إذا كانت أساساً منخفضة، ولكن في حالة العينات المحتوية علي عدد مناسب من الميكروبات (أي أعلى من ١٠٠ وحدة تكوين مستعمرة بالجرام أو المللي) فتفضل طريقة العد علي الأطباق التي تعطي تقديرات أكثر دقة من طريقة MPN والتي يعيبها أيضاً أنها تحتاج إلي عدد كبير نسبياً من الأنابيب أو الأطباق.

طريقة العد المجهرى المباشر

Direct microscopic enumeration method

- تعتمد هذه الطريقة علي فحص غشاء من عينة اللبن أو منتجاته تحت المجهر بحيث يمكن تمييز خلايا الأنواع المختلفة من الميكروبات في العينة وعدها، ولقد تم استخدام هذه الطريقة لفترات طويلة في مصانع الألبان سواء للحصول علي تقدير سريع وتقريبي لأنواع الميكروبات (بكتريا، خمائر، أعفان، الخ...) وكذلك للعدد البكتيري الكلي أو لعدد الخلايا الجسمية (Somatic cells) التي تكثر في اللبن عندما يكون ناتجاً من حيوانات مصابة بالتهاب الضرع أو بعض الأمراض الالتهابية الاخرى بحيث أنه عند زيادة هذه الخلايا عن حد معين فإن هذا يدل علي احتمال أن اللبن ناتج من حيوان مريض.
- إلا أن من أهم عيوب طريقة العد المجهرى المباشر هو أنه لا يمكن من خلالها التمييز بين الخلايا الحية والميتة حيث أن كل منهما يظهر بنفس الشكل تقريباً تحت المجهر الضوئي،

ثانياً: طرق العد الغير مباشرة

- نظراً لزيادة حجم الانتاج في مصانع الألبان بما قد يصل إلي عدة أطنان من المنتجات اللبنية يقوم بإنتاجها مصنع متوسط أو كبير الحجم في اليوم الواحد فإن صناع الألبان وكذلك مراقبو الجودة يحتاجون إلي تحديد الجودة الميكروبيولوجية للمنتجات اللبنية باستخدام طرق بسيطة وسريعة تعطي نتائج خلال بضعة دقائق أو ساعة علي الأكثر بما يساعد علي إمكانية الانتقال من خطوة لأخرى أثناء التصنيع أو التصريح بتسويق المنتجات.
- وهذه الطرق تتميز بالسرعة تعتمد علي تقدير التغيرات المصاحبة لنشاط ونمو البكتريا وتتخذها كمؤشر للعدد البكتيري في العينات المختبرة وهذه تعرف بالطرق الغير مباشرة ومن أهمها ما يلي:

١- طريقة اختزال الصبغات (Dye-reduction test)

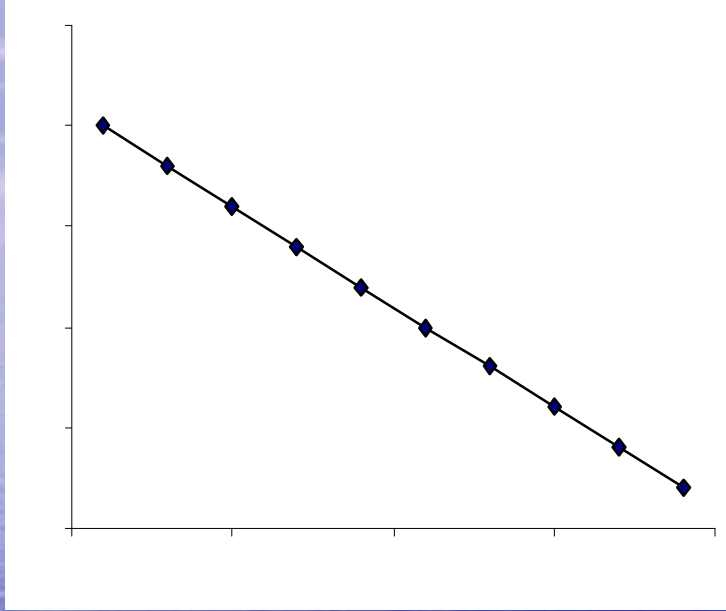
وتتميز هذه الطريقة بالسرعة والبساطة وأنها غير مكلفة ولا تتطلب جهداً في إجرائها، ومن أهم مميزاتا أيضاً أنها تعتمد علي نشاط الخلايا الميكروبية الحية فقط، وتتلخص فكرتها في أنه أثناء نشاط البكتريا ونموها في اللبن فإنها تقوم بخفض جهد الأوكسدة والاختزال (Redox (Eh (potential) في اللبن وذلك لما تكونه من مركبات مختزلة وهذا يعمل علي تغير لون بعض الصبغات مثل أزرق الميثيلين (Methylene blue) والريزازورين (Resazurin) والتي تكون ملونه في الوسط المؤكسد بينما يختزل لونها في الأوساط المختزلة ولقد وجد أن هناك ارتباط عكسي بين الوقت اللازم لاختزال الصبغة والعدد الكلي من البكتريا في عينات اللبن، بحيث أنه كلما قصر الوقت اللازم لاختزال الصبغة كلما دل ذلك علي وجود عدد منخفض من البكتريا والعكس.

٢- الطرق الكهربائية Electrical Method

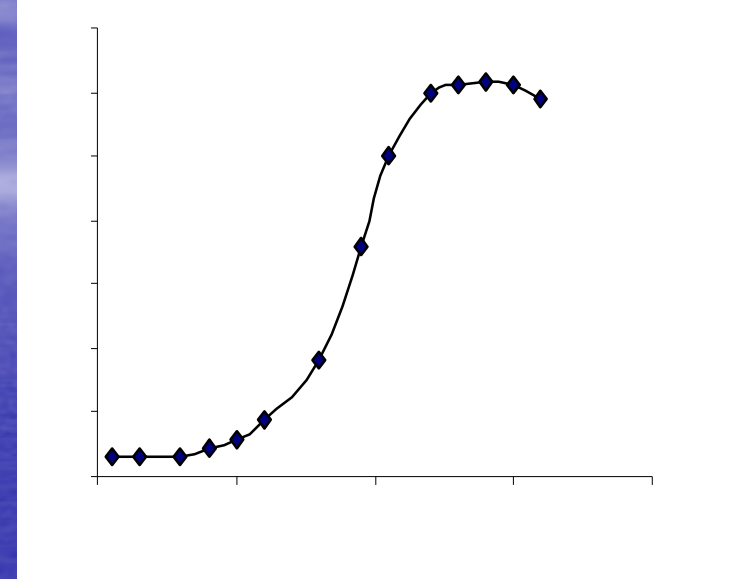
● كما في طريقة اختزال الصبغات فإن الطرق الكهربائية تعتمد علي نشاط الخلايا الحية من الميكروبات وقيامها بإحداث تغير يمكن قياسه في وسط النمو (اللبن مثلاً)، والتغير في هذه الحالة هو زيادة التوصيلية الكهربائية (Electric conductivity) في الوسط حيث نجد أن البكتريا خلالها نشاطها في الغذاء تستطيع إنتاج مركبات أيونية تعمل علي زيادة التوصيلية الكهربائية للوسط بما يجعل هناك ارتباط بين العدد البكتيري في العينات المختبرة والتغير في التوصيلية الكهربائية.

● وتتلخص هذه الطريقة في وضع العينة المراد اختبارها في خلية (Cell) تحتوي علي ٢ الكترود بالإضافة إلي بيئة مغذية تعمل علي زيادة التغير الذي يحدث في التوصيلية الكهربائية نتيجة نشاط البكتريا، ويتم قياس وتسجيل التوصيلية الكهربائية للتيار المار بين الألكترودين كل بضعة دقائق (٦ أو ١٢ دقيقة) بحيث أنه في نهاية التجربة يتم الحصول علي شكل بياني

عدد البكتريا في العينة المختبرة



التغير في التوصيلية الكهربائية



(أ) مراحل التغير في التوصيلية الكهربائية نتيجة نشاط البكتريا في العينة المختبرة.

(ب) العلاقة العكسية بين وقت التقدير وعدد البكتريا في العينة.

٣- الطرق المعتمدة علي تقدير مركب الاديوسين ثلاثي الفوسفات (ATP)

- تعتمد علي أن مركب ATP يوجد في جميع الكائنات الحية بما فيها الميكروبات وبالتالي فإنه يمكن تقدير عدد الميكروبات من خلال تقدير تركيز هذا المركب في العينات المختبرة، ويتم ذلك بتحضير العينة كما سبق ذكره في الدرس العملي السابق، ثم يضاف إليها معقد من مركب اللوسيفرين وإنزيم اللوسيفيريز (Luciferin-luciferase complex) وأيونات الماغنسيوم بحيث أنه في وجود مركب ATP يقوم الإنزيم بتحويل مركب اللوسيفرين إلي أوكسيلوسيفرين (Oxyluciferin) مع انطلاق ضوء نتيجة تحلل مركب ATP كما بالمعادلة التالية:



الأجهزة والأدوات

- مجهر ضوئي
- ماصات زجاجية معقمة ومعها صاحب بلاستيك.
- ماصات ميكرولتريّة.
- أسنان ماصات ميكرولتريّة (Tips) معقمة
- شرائح زجاجية.
- إبر تلقيح.

المواد

- محلول ملحي تركيزه ٠.٨٥% (saline) معقم وموزع بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار أو بيئة الاسترجاع الأقصى (Maximum recovery diluent) معقمة ومعبأة بمعدل ٩ مللي في أنابيب اختبار.
- صبغة أزرق الميثيلين.
- زيلول.

الخطوات

- قم بتحضير عينات اللبن الخام ولبن UHT واليوجورت والجبن الدميّاطي والزبد واللبن المجفف كما سبق أن فعلت في الدرس العملي السابق.
- انقل ٠.٠١ ملى أي ١٠ ميكروليتر باستخدام ماصة ميكرولتريّة إلى سطح شريحة بريد (Breed) المرسوم عليها ١ سم ٢ ثم قم بنشر العينة باستخدام عقدة ابرة التلقيح بحيث يتم فردها على مساحة الواحد سم ٢.
- جفف الشريحة في الهواء ثم قم بثبيت الغشاء بإمراره ٢-٣ مرات خلال الّهب.
- ضع الشريحة في الزيلول لمدة ١ دقيقة للتخلص من الدهن ثم جففها في الهواء.
- اصبغ الشريحة بأزرق الميثيلين لمدة نصف دقيقة ثم اغسلها بالماء وجففها وافحصها بالعدسة الزيتية.

● قم بتقدير عدد الخلايا في الحقل المجهرى ثم قم بعدها في حقل آخر وهكذا حتى يكون لديك عدد الخلايا في حوالي ٢٠ حقل مجهرى.

● قم بحساب عدد الخلايا في العينة كما يلي:

أ- يتم حساب متوسط عدد الخلايا في الحقول المجهرية.

ب- يتم حساب مساحة الحقل المجهرى وذلك بمعرفة قطر الحقل المجهرى والذي عادة ما يتراوح ما بين ١٤٠-١٦٠ ميكرون وباعتبار أن الحقل المجهرى يكون دائري الشكل فإن مساحة الحقل يتم حسابها من المعادلة:

$$\text{مساحة الحقل} = \pi \text{ نق}^2$$

حيث: $\pi = ٣.١٤$ ، $\text{ق} = \text{نصف القطر}$.

ج- بمعرفة مساحة الحقل المجهري يمكن حساب عدد الحقول المجهرية في الواحد سم² من الشريحة وذلك بقسمة الواحد سم² علي مساحة الحقل الواحد مع مراعاة تحويل مساحة الحقل بالميكرون المربع إلي السم المربع وذلك بقسمة المساحة علي ١٠٨، ويطلق علي عدد الحقول المجهرية في ا سم² اسم المعامل المجهري.

د- بضرب المعامل المجهري في متوسط عدد الخلايا في الحقل المجهري الواحد نحصل علي عدد الخلايا في ١٠٠ ميكروليتر من اللبن أو منتجاته ومن الرقم الناتج يمكننا حساب عدد الخلايا في ١ ملي أو جرام وذلك بضربه في العدد ١٠.

قم بإجراء حساباتك مع العينات المختلفة في الفراغ التالي
ثم سجل النتائج في الجدول

عدد الخلايا في ١ ملي	عدد الخلايا في ١٠٠ ميكرو لتر	المعامل المجهري	متوسط عدد الخلايا في الحقول	العينة
				لبن خام لبن UHT يوجورت جبين دمياطي زبد لبن مجفف