

الدرس العملي السابع

طرق عد البكتيريا في اللبن ومنتجاته

أولاً: طريقة العد علي الأطباق

أهداف الدرس

- q التعريف بمفهوم الجودة الميكروبيولوجية للبن ومنتجاته.
- q التعريف بصفة عامة بأهم طرق عد البكتريا في اللبن ومنتجاته.
- q التعريف بالأساس العلمي لطريقتي العد علي الأطباق وأفلام بتري.
- q التدريب علي إعداد عينات اللبن ومنتجاته للتحليلات الميكروبيولوجية.
- q التدريب علي طريقة العد علي الأطباق لتقدير العدد البكتيري الكلي في اللبن ومنتجاته.
- q التدريب علي طريقة أفلام بتري لتقدير العدد البكتيري الكلي في اللبن ومنتجاته.

طرق عد الميكروبات في اللبن

q أولاً: طرق مباشرة (Direct Methods): وهى تعتمد علي

التعامل المباشر مع الميكروبات وتشمل:

● العد علي الأطباق Plate count method

● العد بطريقة الرقم الأكثر احتمالاً

Most probable number (MPN) method

● العد المجهرى المباشر

Direct microscopic enumeration method

q ثانياً: طرق غير مباشرة (Indirect Methods): ويتم من

خلالها عد الميكروبات اعتماداً علي تقدير نشاط فسيولوجي معين

تقوم به ويكون مرتبطاً بالعدد الكلي لها، وتشمل هذه الطرق:

- طريقة اختزال الصبغات Dye-reduction test
- الطرق الكهربائية Electrical methods
- الطرق المعتمدة علي تقدير مركب الاديوسين ثلاثي الفوسفات (ATP).

وسوف يكون تركيزنا في هذا الدرس علي أحدي الطرق المباشرة وهي طريقة العد علي الأتباق.

طريقة العد علي الأطباق

- تتلخص هذه الطريقة في تحضير العينة المراد اختبارها بحيث تكون في صورة معلق سائل مع عمل سلسلة من التخفيفات العشرية (Decimal dilutions) من هذا المعلق (أي يتم تخفيف المعلق عشرة مرات في كل مرة تخفيف) ثم تؤخذ عينات من تلك التخفيفات ليتم مزجها بيئة زرع (Culture medium) مصبوبة في أطباق بتري ثم يتم تحضين تلك البيئة تحت ظروف مناسبة من حيث درجة الحرارة والتهوية وذلك لمدة يوم إلي ثلاثة أيام ثم يتم عد المستعمرات (colonies) التي تظهر علي الأطباق.

الأجهزة والأدوات

- حمام مائي مضبوط علي ٥٠°م.
- حضانات كهربية (Incubators).
- ماصات زجاجية معقمة ومعها ساحب بلاستيك.
- ماصة ميكرولتريية.
- أسنان ماصات ميكرولتريية (Tips) معقمة.
- ناشرات (Spreaders) أو ابر تلقيح بلاستيكية معقمة.
- أطباق بتري معقمة.

المواد

- بيئة أجار الطرق القياسية (Standard methods agar) معقمة وتم صب كمية منها في أطباق بتري والكمية الأخرى معبأة في دوارق مخروطية.
- 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.
- أفلام بتري خاصة بالعد الكلي للبكتري

تحضير عينات اللبن ومنتجاته

- سوف نستخدم الخطوات التالية لتحضير عينات اللبن ومنتجاته لاختبار تقدير العدد الكلي من البكتيريا، ولكن يجب أن نلاحظ أن هذه الخطوات يتم أيضاً القيام بها عند فحص اللبن ومنتجاته في الاختبارات الميكروبيولوجية الأخرى التي تجري للكشف عن أو تقدير أعداد أنواع معينة من الميكروبات وذلك باستخدام بيئات الزرع الصلبة أو السائلة

أ- تجهيز عينات اللبن الخام:

- عند استلام اللبن الخام في خزانات (Tanks) أو أقساط فإنه يتم تقايبه جيداً باستخدام مقلب (Plunger) معقم ثم تؤخذ منه عينات باستخدام مكيال (منطال) (Dipper) معقم (راجع الدروس العملية في مقرر اللبن السائل ومعاملاته لمزيد من التفاصيل حول هذه الأدوات) وتوضع هذه العينات في زجاجات معقمة ثم ترسل للمعمل، ونظراً سيوله العينة فيمكن تخفيفها مباشرة بدون الحاجة إلي خطوات أخرى.

ب. تجهيز عينات اللبن المبستر ولبن UHT:

● عادة ما يتم تعبئة اللبن المبستر في أكياس أو علب بلاستيكية بينما يتم تعبئة لبن UHT في عبوات تتراباك (Tetra pack) ، وعند أخذ عينات من هذه الألبان فإنه يتم تحديد جزء علي سطح العبوة ويتم تعقيمه باستخدام الكحول الايثيلي (تركيزه ٧٥%) ثم يتم غرس سرنجة (حقنة) معقمة في العبوة ويتم سحب عينة مناسبة توضع في زجاجة معقمة ويتم تخفيفها فيما بعد.

ج. تجهيز عينات اللبن المكثف

يتم مزج عبوة اللبن المكثف جيداً وتسخينها علي ٤٥°م لبضعة دقائق ثم يوزن منها ١١ جرام يتم وضعها في زجاجة معقمة ويضاف إليها ٩٩ ملي من محلول تخفيف معقم ثم يتم المزج جيداً.

د. تجهيز عينات الزيت:

نظراً لأن الزيت يكون ذا قوام دهني فيتم تحضيره عيناته من خلال الخطوات التالية:

١. يتم أخذ عينات من الزيت باستخدام سكينه أو أداة أخرى معقمة ويتم وضع هذه العينات في أوعية أو زجاجات معقمة يتم نقلها إلى حمام مائي علي 40°C لمدة ١٥ دقيقة مع الرج الرحوي لصهر الزيت، ويراعي ألا تزيد درجات الحرارة أو مدة الصهر عن ذلك حتى لا تتأثر الميكروبات بالعينة، ويساعد علي إتمام الصهر الجيد للعينات أن لا يزيد حجمها عن ٥٠% من حجم الوعاء أو الزجاجه.

٢. يتم سحب ١١ مللي من عينة الزبد المنصهر بواسطة الماصة ثم تمزج ب ٩٩ مللي من محلول التخفيف ثم تستكمل عملية التخفيف، ويراعي قبل ذلك أن يكون قد سبق تدفئة محلول التخفيف والماصات المستخدمة إلي درجة ٤٠-٤٥°م بحيث لا يحدث تصلب للزبد أثناء تخفيفه، كذلك يراعي أن يتم سحب كمية من محلول التخفيف الدافئ بواسطة الماصة التي تؤخذ بها عينة الزبد المنصهر قبل سحب العينة بها وذلك يساعد علي بلل الجدار الداخلي للماصة مما يقلل من التصاق الزبد بجدار الماصة.

هـ. تجهيز عينات الجبن والألبان المتخمرة:

١. يتم أخذ عينة من الجبن باستخدام قلم أخذ العينات المعقم ويتم وضعها في كيس معقم وهرسها بلطف وهي بداخل الكيس أو يمكن نقل العينة إلي زجاجة معقمة مع هرسها باستخدام ساق زجاجية أو معدنية معقمة، أما الألبان المتخمرة مثل اليوجورت فيمكن مزجه جيداً وهو في عبوته باستخدام ساق زجاجية أو معدنية معقمة.

٢. يتم وزن ١١ جرام من عينة الجبن أو اليوجورت الممزوجة جيداً وتنقل إما إلي خلاط (Blender) أو هون (Mortar) أو جهاز Stomacher (أنظر الصورة في شكل ٨) ثم يضاف إلي العينة ٩٩ مللي من محلول سترات الصوديوم (٢%) المعقم والذي سبق تدفئته إلي ٤٠-٤٥°م ثم يتم المزج بطريقة مناسبة، وفائدة سترات الصوديوم في هذه الحالة هو المساعدة في استرجاع البروتينات المتجبنة إلي حالة المعلق

● جهاز Stomacher بدأ استخدامه في معامل ميكروبيولوجيا الأغذية منذ عام ١٩٧١ ويتم فيه وضع العينة الصلبة المراد اختبارها في كيس بلاستيك خاص معقم ويضاف إليها محلول التخفيف ثم يوضع الكيس في الجهاز حيث تتعرض العينة للتكسير والمزج الجيد بالمحلول من خلال حركة مضربين (Paddles)، ويتميز جهاز Stomacher عن الخلاط في أنه لا يحتاج إلى الغسيل والتعقيم بين عينة وأخرى، كذلك فإنه عند التشغيل لمدة مناسبة (حوالي ٢ دقيقة) لا تتكون حرارة في العينة أثناء خلطها وتكسيرها مع المحلول، ويمكن حفظ الأكياس بما تحتويه من عينات بعد ضربها ومزجها بالمحلول تحت تبريد لحين استخدامها، إضافة إلى ذلك فإنه لا ينتج عن تشغيل الجهاز ضوضاء مزعجة مثل الخ



أ- صورة عامة لجهاز Stomacher الذي يستخدم في تحضير عينات المنتجات اللبنية الصلبة (الجبنة، الزبد، اليوجورت، إلخ..) للاختبارات الميكروبيولوجية.



ب- عينة جبنة في كيس معقم ومضاف إليها محلول التخفيف قبل وضعها في الجهاز (علي اليسار) وبعد وضعها في الجهاز (علي اليمين) حيث تم ضغطها وهرسها وامتزاجها بمحلول التخفيف.

و- تجهيز عينات الأيس كريم والمنتجات اللبنية المجمدة الأخرى:

يتم صهر الأيس كريم بتركه وهو في عبوته لمدة ١٥ دقيقة علي درجة حرارة الغرفة، ثم يتم مزجه جيداً ويوزن منه ١١ جرام توضع في زجاجة معقمة ويضاف إليها ٩٩ مللي من محلول تخفيف معقم ثم يتم المزج لضمان تجانس المعلق.

ز- تجهيز عينات اللبن المجفف:

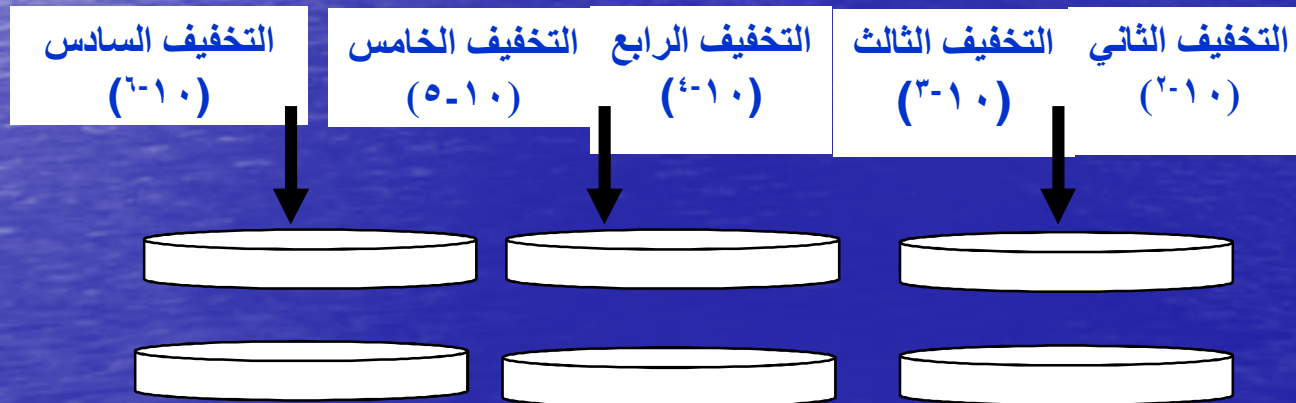
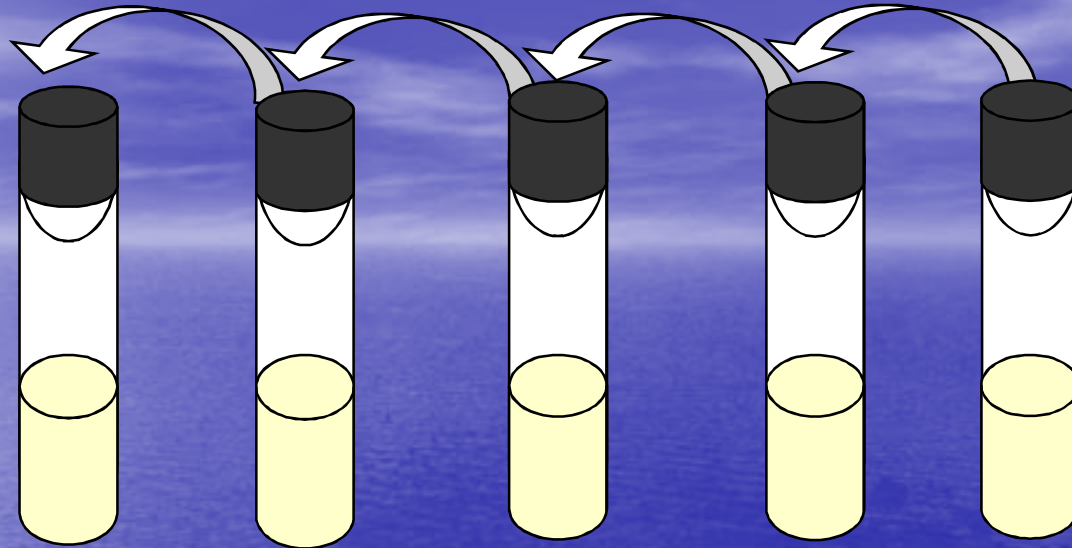
يتم وزن ١١ جرام من اللبن المجفف في زجاجة معقمة ويضاف إليها ٩٩ مللي محلول تخفيف سبق تدفئته إلي ٤٠-٤٥°م وتمزج جيداً ثم تترك حوالي دقيقتين حتى تحدث إعادة تشرب (Rehydration) لبروتين اللبن بالماء ثم تقلب الزجاجة من أعلي لأسفل حوالي ٢٥ مرة لتمام الاسترجاع والامتزاج

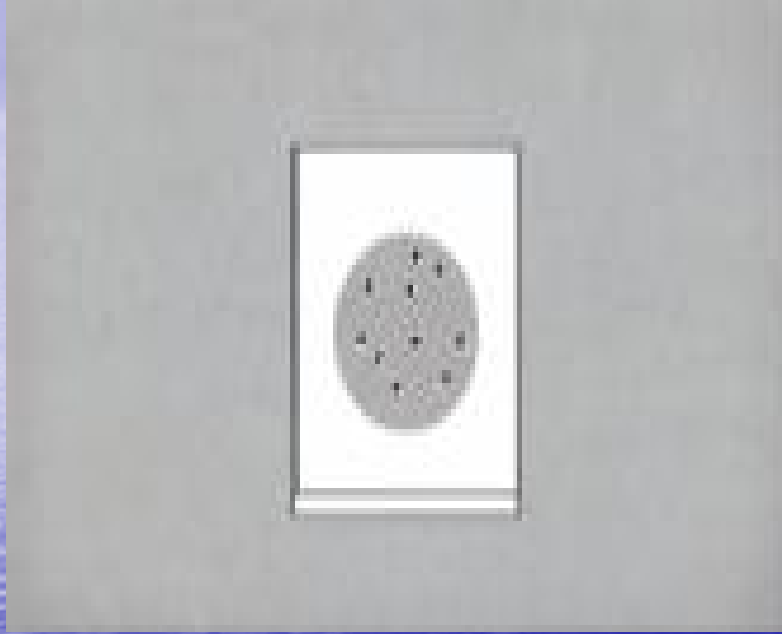
إجراء اختبار العد الكلي للبكتيريا في عينات اللبن ومنتجاته بعد تحضيرها

- في هذا الجزء سوف نقوم بعمل سلسلة من التخفيفات العشرية (Serial ten-fold dilutions) من عينة اللبن أو منتجاته بعد تحضيرها كما سبق في الجزء الأول وذلك بحيث تكون النسبة بين العينة ومحلول التخفيف ٩:١
- ويجب عدم استخدام الماء المقطر في التخفيف حيث أن فقره في الأملاح والمواد الصلبة يسبب صدمة أسموزيه للميكروبات وغالباً ما يفضل إما استخدام محلول ملحي (saline) يحتوي علي كلوريد الصوديوم بتركيز ٠.٨٥% أو محلول الاسترجاع الأقصى (Maximum recovery diluent (MRD)) والذي يتكون من كلوريد الصوديوم (٠.٨٥%) وبيتون.

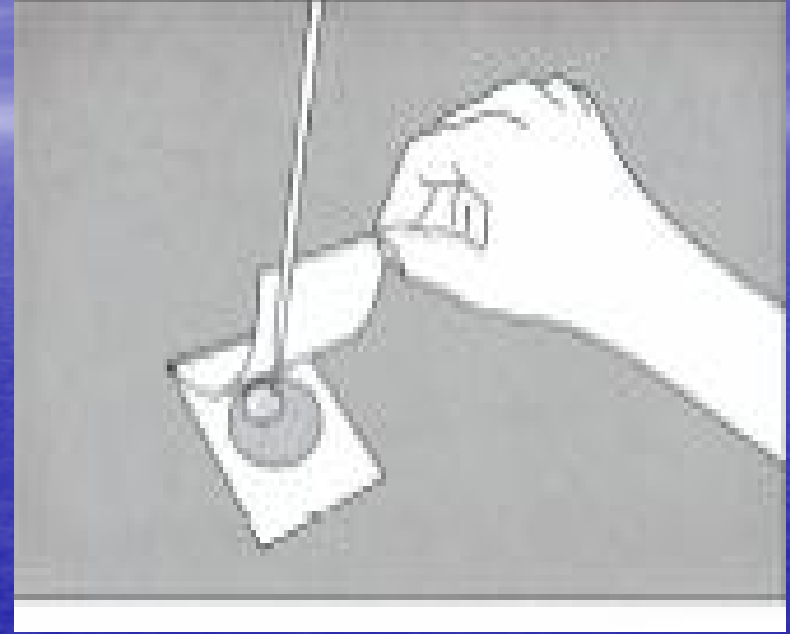
● ويتم أخذ حجم مناسب من التخفيفات التي تم تحضيرها من العينة المختبرة ليتم مزجها ببيئة الزرع (انظر شكل ٩)، ويختلف هذا الحجم باختلاف طريقة المزج، ففي طريقة الأطباق المصبوبة (Pour plates) يتم أخذ ١ مللي من التخفيف ويوضع في طبق بتري المعقم ثم تضاف بيئة الزرع والتي تم صهرها وتبريدها إلي درجة حرارة ٥٠ م°

● أما في طريقة الأطباق المنشورة (Spread plates) فيتم صب البيئة (التي تم صهرها وتبريدها إلي ٥٠ م°) في الأطباق ثم تترك حتى تبرد وتتصلب (ويفضل أن يتم ذلك قبل إجراء اختبار عد الميكروبات بيوم أو يومين وذلك حتى يكون سطح البيئة جافاً) ثم يوضع ٠.١ مللي (١٠٠ ميكروليتر (μl) من التخفيف علي سطح البيئة في الطبق ثم ينشر باستخدام ناشر (Spreader) أو إبرة تلقح بلاستيك.





ظهور المستعمرات الصغيرة



إضافة ١ مللي من العينة

استخدام أفلام بتري في تقدير العدد البكتيري الكلي

ويمكن تلخيص ما يجب أن تفعله في الخطوات التالية:

- قم بعمل تخفيفات عشرية من عينات اللبن الخام ولبن UHT واليوجورت والجبن الدميّاطي والزبد واللبن المجفف كما هو موضح عليه.
- قم باختيار التخفيفات المناسبة من كل عينة وقم بتلقيح كل تخفيف في ثلاثة أطباق بتري أحدهما بحيث يتم المزج في أحد الأطباق بطريقة الأطباق المصبوبة والثاني بطريقة الأطباق المخطوطة والثالث بطريقة ميلس-ميسرا، وكذلك قم بتلقيح فيلم بتري بنفس التخفيف.
- قم بتحضير الأطباق علي درجة حرارة ٣٢°م لمدة ٤٨ ساعة.
- قم بعد المستعمرات الناتجة يدوياً أو باستخدام جهاز عد المستعمرات (Colony counter).

أحسب العدد الكلي للبكتريا باستخدام المعادلة السابق توضيحها
وسجل النتائج في الجدول التالي

العدد الكلي (وحدة تكوين مستعمرة/ الملي (cfu ml ⁻¹)) الناتج بالطرق المختلفة				العينة
أفلام بتري	ميلس-ميسرا	الأطباق المنشورة	الأطباق المصبوبة	
				لبن خام لبن UHT يوجورت جبين دمياطي زبد لبن مجفف