التقدير الكلي للنمو البكتيري والفطري

٤-التقدير الكلي للنمو البكتيري والفطري

Growth measurement

تستخدم عدة طرق لتقدير نمو الكائنات الدقيقة وذلك لاستخدامها في كثير من الدراسات التطبيقية كمعرفة عدد خلايا البكتيريا Cell numbers في المواد الغذائية لتحديد مدى صلاحيتها للإستخدام أو لإنتاج مواد معينة من الكائنات الدقيقة كالتقدير الحيوي للفيتامينات والأحماض الأمينية أو بحساب كتلة الخلايا Cell masses للقيام ببعض الدراسات على الكائنات الدقيقة كتأثير المواد المختلفة والمعاملات الفيزيائية والكيميائية على النمو.

وتستخدم الطرق التي تفيد تقدير أعداد الخلايا المفردة في تقدير عدد خلايا البكتيريا والخميرة أما الطرق التي تستخدم في تقدير كتلة الخلايا فتستخدم في تقدير النمو للكائنات الخيطية مثل الفطريات.

ومما هو جدير بالذكر أن هذه الطرق تستخدم في عدة تطبيقات في مجالات مختلفة في الحياة العملية وذلك بحسب الحاجة إليها وبحسب الطريقة والدراسة المتبعة .

وللقيام بتقدير نسبة النمو الكلي للبكتيريا أو الفطريات بشكل عام هناك عدة طرق مستخدمة للقيام بهذه العملية ومنها:

١- التقدير المباشر لعدد الخلايا: cell numbers :

ومن أكثر الطرق شيوعاً لتقدير عدد الخلايا طريقة العد

بالأطباق plate count ولها عدة نماذج مثل العد المباشر للخلايا وكذلك العد للمستعمرات مع استخدام طريقة التخفيف

.

٢- التقدير غير المباشر لعدد الخلايا.

٣- تقدير الوزن الجاف للخلايا.

٤- تقدير النيتروجين الكلي في الخلايا.

٥- تقدير درجة التعكير (منحنى النمو).

٦- تقدير درجة إنتاج الحمض.

ملاحظة : يمكن اتباع أي من الطرق السابقة بحسب ما يحتاجه الباحث أو حسب الإمكانيات المتوفرة.

وسنقوم هنا بعرض بعض الطرق المستخدمة للتقدير الكمي والكلي للنمو البكتيري والفطري.

٤-١- التقدير المباشر لعدد الخلايا: Cell count

يمكن استخدام الميكروسكوب للقيام بتقدير عدد الخلايا مباشرة في عينة ما وذلك لسهولة إجراء هذه الطريقة وسرعتها ويلاحظ أن هذه الطريقة لا تميز بين الخلايا الحية وغير الحية . ومن هذه الطرق.

أ - استعمال شرائح عد كريات الدم:

خطوات العمل:

١- حضر مزرعة حديثة السن ٤٨ ساعة نامية في بيئة المرق المغذي من بكتيريا. Bacillus subtilis , E.coli

٢- خذ شريحة عد كريات الدم) هيموسيتوميتر (Haemocytometerحيث أن هذه الشرائح تحتوي على غرف خاصة ومقسمة إلى مربعات يمكن استخدامها بسهولة في عملية العد.

٣- خذ قليلاً من البيئة بواسطة ماصة معقمة وضع بضع قطرات على الشريحة حتى تغمر حجرة العد ثم غطها بغطاء شريحة نظيف.

٤- افحص الشريحة باستخدام العدسة الزيتية وذلك بعد ٢٠ مربع ويراعى عند العد حساب الخلايا الموجودة فوق الضلعين المكونين للزاوية اليسرى من المربع.

٥- يقدر عدد الخلايا في كل مربع ثم يحسب عدد الخلايا الكلي

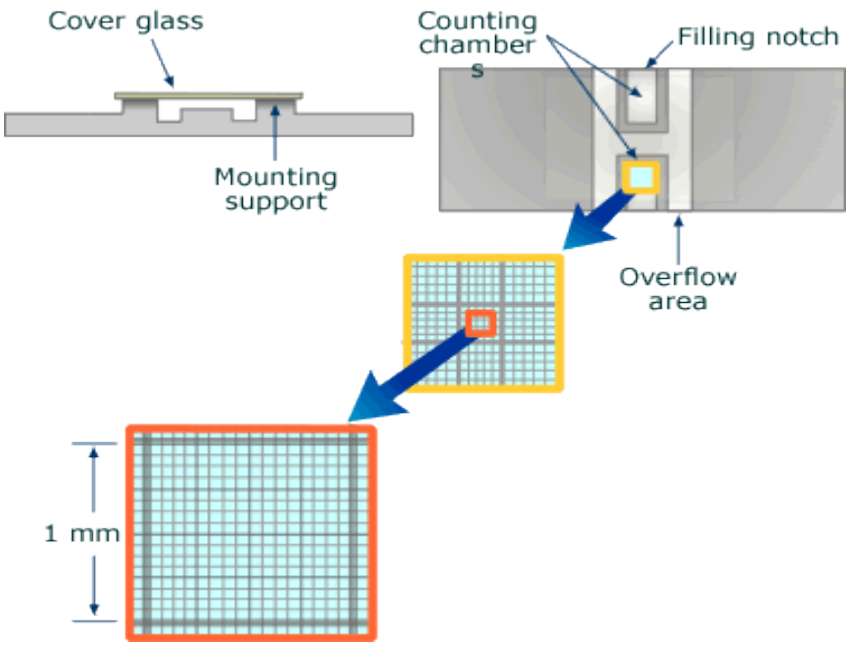
باتباع طرق حسابية معينة فبذلك يحسب عدد الخلايا البكتيرية في ١ مل من البيئة.

Haemocytometer

ب- استعمال شرائح زجاجية عادية:

١- حضر مزرعة حديثة السن ٤٨ ساعة نامية في بيئة المرق المغذي. Bacillus subtilis , E.coli

٢- حضر شريحتين عاديتين ضع كل منها فوق قطعة من ورق الرسم البياني عليها مربع مساحته ١ سم٢ بحيث يقع في منتصف



الشريحة.

٣- بعد رج الأنبوب المحتوي على النمو خذ ٠,٠١ مل من

المزرعة بواسطة ماصة معقمة وضعها في منتصف الشريحة, وكرر هذه الخطوة بالنسبة للشريحة الثانية.

٤- افرد الكمية المنقولة على كل المربع بواسطة إبرة تلقيح معقمة ثم ثبت الغشاء البكتيري باللهب.

٥- اصبغ الغشاء بواسطة ازرق الميثيلين لمدة نصف دقيقة ثم اغسل الشريحة بالماء وجففها.

٦- افحص عشرة حقول مجهرية ثم سجل النتائج بحساب عدد الخلايا في ١مل.

ملاحظة: لحساب مساحة الحقل الميكروسكوبي نستخدم المعادلة (ط نق٢) ويحسب نصف قطر العدسة بالميكرومتر العيني المضبوط ولما كانت كمية العينة المستعملة ٠,٠١ مل وتنتشر في مساحة ١سم٢ فإنه يمكن تقسيم هذه المساحة على مساحة الحقل المجهري للتعرف على عدد الحقول في مساحة الغشاء . وبذلك يحسب عدد الخلايا في ١ مل كما يلي:

١- عدد الخلايا في ٠,٠١ مل=

متوسط عدد الخلايا البكتيرية في الحقل الواحد × عدد الحقول المجهرية

٢- عدد الخلايا في ١ مل = عدد الخلايا في ٠,٠١ مل × ١٠٠

٤-٢- التقدير غير المباشر لعدد الخلايا:

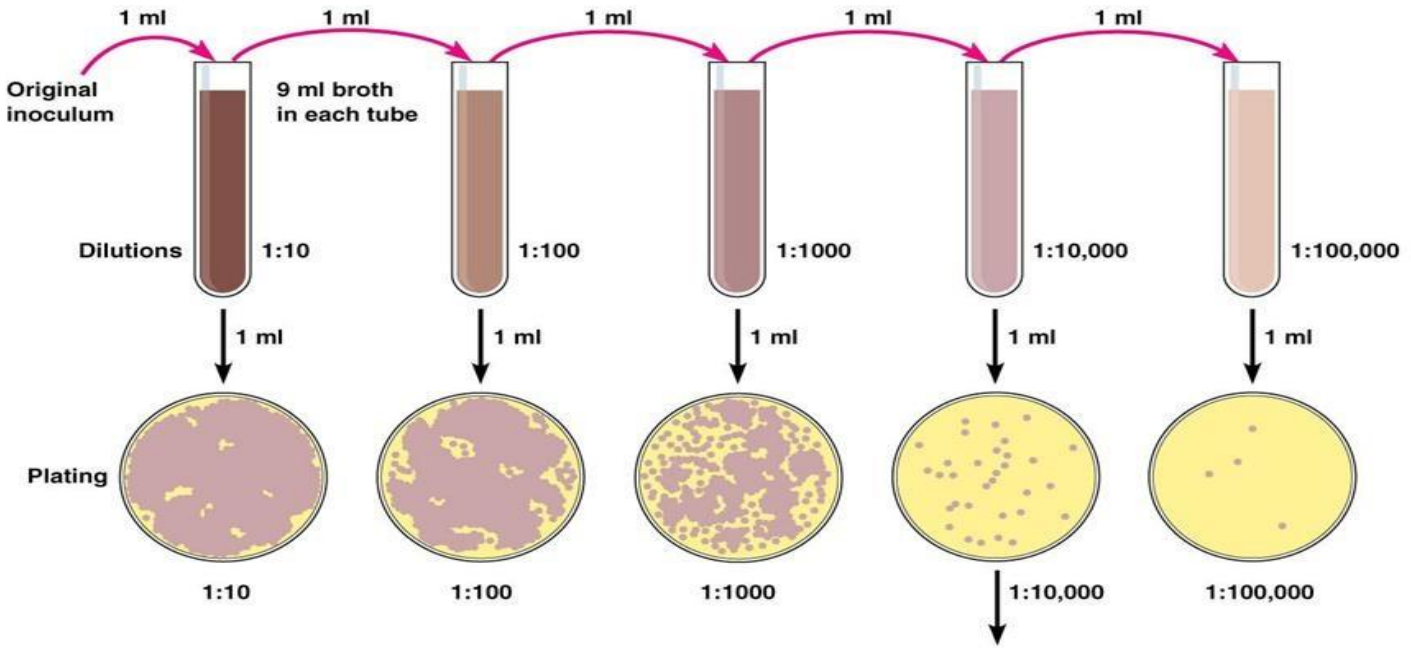
يمكن بهذه الطريقة تقدير عدد الخلايا الحية لذلك يجب استعمال

البيئة الغذائية المناسبة وتعرض المزرعة البكتيرية أو الفطرية لظروف التحضين المناسبة للنوع المراد تقدير عدد مستعمراته , ويجري ذلك باستعمال طريقة العد بالأطباق Plate count أي عد المستعمرات البكتيرية.

- **تقدير عدد الخلايا للبكتيريا بالعد بالأطباق Plate count:**

حيث أن كل خلية حية تنمو لتكون مستعمرة واحدة فإنه يمكن استخدام الأطباق لعد البكتيريا في العينة تقديرياً .

يمكن استخدام طريقة العد بالأطباق وذلك بعمل تخفيفات للعينة ثم زراعتها في أطباق تحتوي على الآجار المتصلب بطريقة الأطباق المصبوبة spread plate method أو بطريقة الأطباق المنتشرةpour plate method , ثم تحضن الأطباق وبعد عملية التحضين تعد المستعمرات المتكونة في الطبق وتضرب في مقلوب التخفيف للحصول على عدد الخلايا البكتيرية في ١ مل من العينة.



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

Copyright © 2007 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

خطوات العمل:

١- رج المزرعة البكتيرية النامية في بيئة المرق المغذي لكي تتوزع الخلايا بانتظام ثم قم بعملية التخفيف التي سبق دراستها.

٢- انقل ١ مل من التخفيفات الأخيرة إلى أطباق بتري ثم صب بها بيئة مسالة من الآجار المغذي مع خلط الخلايا بالوسط الغذائي في الطبق ثم اتركه يتصلب (تسمى طريقة الأطباق المصبوبة) أو يمكن استخدام طريقة الأطباق المنتشرة بوضع ٠,١ مل من التخفيفات المعمولة كل على حدة على سطح الآجار المتصلب في طبق بتري محتوٍ على وسط غذائي متصلب ثم باستخدام ساق زجاجية معقوفة spreader أو مرود معقم انشر العينة على سطح الوسط الغذائي.

٣- حضن الأطباق في الحضان عند ٣٧°م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ثم احسب عدد المستعمرات النامية في كل طبق بعد المستعمرات النامية في كل طبق وحسب التخفيف بحيث يتراوح عدد المستعمرات بين ٢٠ – ٢٠٠ مستعمرة.

٤- احسب عدد الخلايا الحية في ١ مل من المزرعة الأصلية بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق بمقلوب التخفيف المستعمل.

ويمكن عد المستعمرات النامية في الأطباق باستعمال أجهزة مناسبة مثل عداد مستعمرات كويبيك Quebec colony counter المحتوي على قاعدة وعدسة مكبرة بحيث تعلَم كل

مستعمرة بقلم حتى لايتم تكرارها أثناء العد ولا بد من عد جميع المستعمرات النامية على الوسط الغذائي.

- **قياس نمو الفطريات:**

خطوات العمل:

١- بالنسبة للخمائر وحيدة الخلية فيمكن استخدام شريحة عد كريات الدم بأخذ معلق خميرة ووضع قطرات على الشريحة ثم القيام بالعد بنفس الطريقة في البكتيريا.

٢- بالنسبة للفطريات الخيطية نقوم بقياس قطر النمو الدائري للفطر وذلك باتباع الخطوات التالية :

- ضع قرص قطره ١ سم مأخوذ من طبق نام عليه فطر بواسطة الثاقب الفليني ووضعه في منتصف طبق بتري يحتوي على وسط غذائي مناسب وتحضينه عند ٣٣°م لمدة ٧ أيام.

- نقيس قطر النمو خلال السبعة أيام بانتظام وكل يوم لمعرفة معدل النمو في هذا الفطر يومياً .

كما يمكن إجراء هذا الإختبار بعمل سبعة أطباق وزراعتها بنفس الطريقة السابقة ثم تحضن ويؤخذ كل يوم طبق ويقاس قطر المستعمرة للتعرف على مقدار النمو في كل طبق من خلال مقارنة الأطباق في نهاية مدة التحضين.

ويمكن القيام بهذه الطريقة للتعرف على مدى سرعة النمو وكميته لعدة أنواع من الفطريات الخيطية.

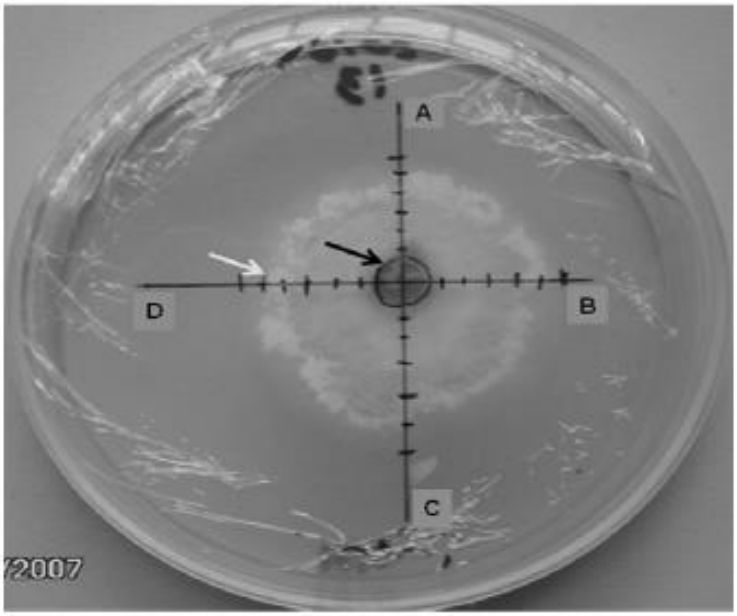


Figure 1. Petri dish used for fungus growth bioassay. Black arrow indicates the edge of initial inoculum. White arrow indicates the edge of fungi radial growth six weeks after bioassay start. Letters A, B, C, D correspond to the four segments used for growth measurements.

٤-٣- تقدير الوزن الجاف للخلايا:

بعض الدراسات تحتاج لتقدير الوزن الجاف للخلايا سواء للفطر أو البكتيريا باعتبار أن ٩٠٪ من وزن الخلية هو ماء . وتختلف هذه النسبة تبعاً للنوع.

وعند تقدير الوزن الجاف للخلايا يجب التخلص من آثار البيئة النامية عليها بغسل الخلايا عدة مرات بالماء المقطر والمعقم.

سنقوم على سبيل المثال بحساب الوزن الجاف لنمو فطري

.

خطوات العمل:

١- حضر بيئة الفطريات (تشابكس دوكس بدون آجار) ثم وزعها في سبعة دوارق حجم ١٠٠ مل بكل منها ٥٠ ملل من البيئة ثم أغلقها بسدادات قطنية.

٢- عقم الدوارق في الأوتوكليف وبعد ذلك اتركها لتبرد.

٣- تحت اللهب ضع لاقحة من الفطر ثم حضن الدوارق عند ٣٣ْم لمدة ٧ أيام.

٤- لحساب الوزن الجاف قم بعمل طرد مركزي لكل دورق عند سرعة ١٠٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق وذلك لترسيب الخلايا في الأنبوب ثم تخلص من البيئة الرائقة فوق الخلايا.

٥- قم بوضع ١٠ مل ماء مقطر ومعقم ثم رج بشدة لغسل الخلايا من آثار البيئة ثم قم بعملية الطرد المركزي , كرر عملية الغسيل ثلاث مرات.

٦- بعد الغسيل ضع ١٠ مل ماء مقطر ومعقم و رج الأنبوب جيداً ثم رشح المعلق بورق ترشيح بعد أخذ الوزن الجاف للورقة.

٧- قم بأخذ الورقة بما عليها من الخلايا وضعها في فرن جاف عند ٧٠ْم لمدة ٢٤ ساعة للحصول على خلايا جافة.

٨ - زن ورقة الترشيح بما عليها من نمو بعد التجفيف ثم اطرح منها وزن الورقة فنكون بذلك قد حصلنا على وزن الخلايا الجاف فقط.

ملاحظة : يمكن تنفيذ هذه العملية أي حساب الوزن الجاف كل يوم لمدة سبعة أيام وذلك بأخذ دورق كل يوم حتى يلاحظ التغير في الوزن الجاف للفطر تبعاً لزيادة فترة التحضين كتطبيق أو أسلوب مستخدم لهذه الطريقة في الدراسات البحثية.

كما ويمكن اتباع نفس الخطوات لحساب كمية النمو بالنسبة للبكتيريا.

٤-٤- تقدير درجة التعكيرturbidimetry estimation

تقدير النمو البكتيري بالتعكير) ومنحنى النمو Growth curve):

تعتمد هذه الطريقة على أنه كلما زادت درجة تعكير المزرعة (زيادة النمو) كلما قلت كثافة الأشعة الضوئية النافذة Transmittedخلال هذه المزرعة نتيجة أن الخلايا النامية تحجب وتعكس الضوء. فيمكن قياس نفاذية الضوء باستخدام جهاز خاص له وحدة ضوئية حساسة لها القدرة على قياس كمية الضوء

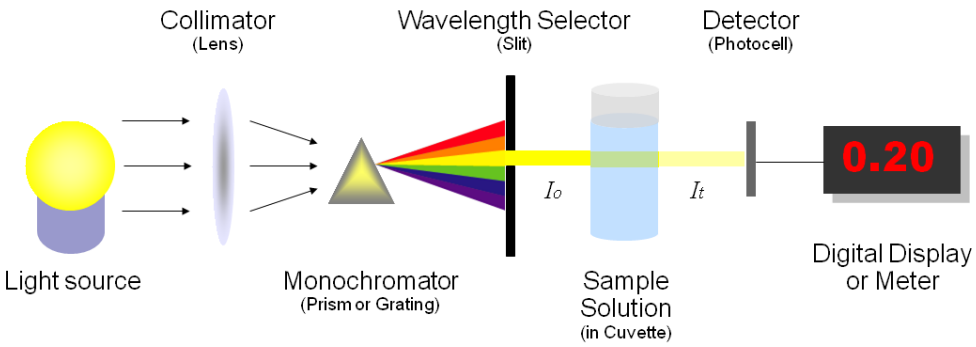
النافذ لها من مصدر ضوئي ذو طول موجي معين. ويلاحظ أن كثافة الشعاع تتناسب عكسياً مع درجة تعكير المزرعة .

فعند مرور الضوء من المصدر ينفذ من خلال المعلق باتجاه الخلية الضوئية للجهاز فكلما زاد النمو زادت العكارة وبالتالي قلت نفاذية الضوء. ويمكن قياس نفاذية الضوء Percentage of transmissionأو الإمتصاص.Absorbance

ويستعمل لهذا الغرض جهاز يسمى المطياف Spectrophotometerوهذه الطريقة من أفضل الطرق وأسرعها وأدقها إلا أنه من الصعب قياس نمو الخلايا الملونة أو الخلايا المفرزة للأصباغ في الوسط الغذائي إلا بعد اختيار الموجة الضوئية المناسبة لكل نوع بكتيري تبعاً للونه وهذه الموجة يكون عندها درجة امتصاص المحلول أكبر ما يمكن.

ومما هو جدير بالذكر أن النمو البكتيري يمر في عدة مراحل بزيادة عدد الخلايا أثناء النمو زيادة منتظمة متدرجة ولكن بالدراسة وجد أن النمو البكتيري يمر بمرحلة الركود Lag phase للتأقلم مع الوسط الغذائي والظروف المحيطة بها ثم تمر في مرحلة النمو اللوغاريتمي Exponential phase تكون في طور النمو المتزايد ويكون معدل النمو ثابتاً , وبمرور الوقت تستهلك المواد من المزرعة وتزداد نواتج التمثيل السامة مما يؤدي إلى بطء معدل النمو ثم تبدأ الخلايا بالموت . Death phase ويتم في هذه

المراحل تتبع عدد الخلايا للتعرف على طبيعة منحنى النمو في



الخلايا البكتيرية .

Spectrophotometer

Spectrophotometer structure

خطوات العمل:

١- حضر مزرعة من البكتيريا E.coli نامية في بيئة سائلة مثل المرق المغذي أو مرق الجلوكوز مسبقاً.

٢- خذ دورق يحتوي على بيئة سائلة واحقنه بالبكتيريا.

٣- خذ من الدورق بماصة معقمة قليلاً من البيئة المحقونة بالعينة وضعها في الخلية الخاصة بجهاز المطياف واضبط نفاذية الضوء عند ١٠٠٪ لتكون عينة معيارية.

٤- خذ ١ مل من المزرعة بواسطة ماصة معقمة من الدورق بعد أن تحضن المزرعة عند ٣٥ْم لمدة ١٥ دقيقة.

٥- حضن الدورق مرة أخرى لمدة ١٥ دقيقة وخذ من الدورق في كل مرة بعد التحضين ملء أنبوبة الجهاز وقم بالقياس . حرك الدورق بعد كل مرة.

٦-كرر الخطوتين ٤ و٥ كل ١٥ دقيقة واستمر في أخذ القراءات حتى تلاحظ عدم حدوث زيادة في قراءة النفاذية.

٧-سجل النتائج في جدول بعد كل قياس ثم ارسم منحنى يبين العلاقة بين الزمن والنمو.

طريقة القياس - :

صل الجهاز بالكهرباء ثم شغل الجهاز ثم اتركه ٥ دقائق.

- اختر طول الموجة المناسب لقياس العكارة من البكتيريا وهي ٥٨٠nm.

-اجعل الجهاز على (٠ %) نفاذية.transmission

-اعمل معايرة للجهاز بوضع أنبوبة الجهاز بها البيئة بدون حقن بكتيري ثم حرك مفتاح

ضبط الضوء حتى يصل المؤشر إلى ١٠٠٪ نفاذية.

-ضع في أنبوبة أخرى للجهاز كمية من المزرعة ثم خذ القراءة o.d (optical density)الكثافة الضوئية.

٤-٥- تقدير النيتروجين الكلي:

تعتمد هذه الطريقة على أن غالبية الخلايا البكتيرية تتكون من البروتين وحيث أن عنصر النيتروجين من أهم مكونات البروتين فإن تقدير النيتروجين الكلي بالمزرعة يكون متلازماً مع كمية النمو وعادة تقدر نسبة النيتروجين في البروتين البكتيري بحوالي ١٤٪ من الوزن الجاف وقد تختلف هذه النسبة حسب نوع الميكروب أو حسب اختلاف الظروف البيئية بالنسبة للنوع الواحد.

خطوات العمل:

١- حضر معلق من الخلايا بعد غسلها بالطرد المركزي باستخدام الماء المقطر لثلاث مرات.

٢- ضع ٢ مل من معلق الخلايا المغسولة في دورق سعة ٣٠ مل ثم أضف إليه ٢ مل من مزيج هضم البروتينات.

٣- سخن محتويات الدورق حتى يتم الترويق واستمر بالغليان بهدوء لمدة ساعة ثم برد المحلول.

٤- أضف ٥ مل من محلول مركز من هيدروكسيد الصوديوم)

N10أساسي (ثم أضف مادة مانعة للرغوة مثل حمض الأوليك أو السيليكون.

٥- صل الدورق بجهاز تقطير صغير مباشرة متصل بأنبوبة استقبال مدرجة تحتوي على ٢ مل حمض كبريتيك ١/ ٢٠ N مع مراعاة غمر أنبوبة التوصيل أسفل سطح الحمض في أنبوبة الإستقبال.

٦- سخن حتى الغليان لمدة ٥ دقائق ثم ارفع أنبوبة التوصيل في الدقيقة الأخيرة فوق سطح الحمض.

٧- خفف المحلول الناتج بكمية معلومة من الماء المقطر بحيث يحتوي المخلوط الناتج ١٠-١٥ ميكروجرام من النيتروجين في المللليتر الواحد.

٨- أضف إلى كمية ٢ مل من السائل المخفف كمية ٢ مل من محلول نسلر و ٣ مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم N2 في أنبوبة قياس اللون.

٩- أترك الأنابيب لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم قس درجة اللون باستعمال السبكتروفوتومتر.

١٠- قدر نيتروجين الأمونيا بالملليجرام / ١ مل من المزرعة البكتيرية واستعن بالرسم

البياني مقارنة باستعمال محاليل من الأمونيا معروف محتوياتها من النيتروجين.

٤-٦-تقدير درجة إنتاج الحمض بالمزرعة :

يقدر النمو كمياً بهذه الطريقة عادة في بكتيريا حمض اللاكتيك وغيرها من أنواع البكتيريا التي تتميز بإنتاج أحماض أثناء نموها بدرجة تكفي لقياسها .ويمكن تقدير درجة الحموضة بمعادلة الحمض بهيدروكسيد الصوديوم أو كربونات الصوديوم فيحسب عدد الملليمترات من الهيدروكسيد المستعملة وهي تتناسب طردياً مع درجة الحموضة في المزرعة المختبرة.

خطوات العمل:

١-حضر عدة مزارع من البكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* ونامية في بيئة اللبن لمدة ١٢ , ٢٤ , ٤٨ ساعة.

٢-انقل ١٠ مل من كل مزرعة إلى دورق مخروطي نظيف ثم أضف إليها عدة نقط من دليل الفينولفيثالين.

٣-عادل حموضة العينة باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم ٠,٠١ أساسي.

٤-احسب عدد ملليمترات الهيدروكسيد المستعملة وهي تتناسب طردياً مع درجة حموضة المزرعة.