استخدام عروة خاصة لتحديد العدد الحي للبكتريا في نماذج مختلفة

مصطفى سامي السلماني زهرة محمود الخفاجي *

تاريخ قبول النشر ٢٠٠٤/٩/٢٩

الخلاصة

استعملت في الدراسة عروة خاصة معيرة لتحديد العدد الحي او العدد العيوشي للبكتريا في نماذج مختلفة (٣٥ نموذج) . قورنت نتائج العروة المستعملة (BM- loop) بنتائج الطرق القياسية مثل طريقة العد القياسي Standard plate count وطريقة صب الأطباق Pour plate count بالاضافة الى استعمال طريقة القطرة Drop method. أسفرت النتائج عن تطابق كبير بين الطرق المستعملة حيث تراوحت قيم معامل الارتباط ٠,٩٧٥ - ٠,٩٨٦ . كما أسفرت نتائج حساب الكلفة الاقتصادية الى ان استعمال العروة (BM) توفر ٨٨,٢٢ % من الكلفة للطرق العادية للنموذج الواحد بالإضافة الى اختزال الجهد المبذول . تم مناقشة أفضلية استعمال العروة على استعمال الطرق الأخرى من حيث مشاكل التلوث وغيرها .

المقدمة

تعد طريقة تقدير العدد الحي او العيوشي (Viable count) للأحياء وحيدة الخلية الطريقة المرجعية لتحديد صلاحية طرائق قياس النمو الأخرى (١) . وقد تتم الطريقة بالزراعة السطحية او طريقة الصب بالأطباق Pour plate count . ولكن من مساوئ هذه الطريقة بالدرجة الرئيسية الكلفة العالية والجهد الكبير الذي تحتاجه (٢) . وهذه من الطرق غير المباشرة التي جرت محاولات لاستبدالها مثل استعمال الطبق الحلزوني Spiral plate count (٣) . وكذلك استعمال طريقة القطرة او طريقة Miles & Misra (٤) .ولكن لكل طريقه مساوئها بحيث لا تكاد توازي صلاحية الطرائق التقليدية (٥) . واستهدفت الدراسة الحالية استعمال عروة مصنعة بمواصفات خاصة (٦) لتحديد العدد الحي للبكتريا في نماذج مختلفة وذلك للتقليل من الكلفة والجهد ولاستعمالها لأغراض خاصة

مواد وطرائق العمل

النماذج: تم اخذ مجموعة من العينات اللحوم ، منتجات الألبان ، فواكه ، ترب ، نماذج إدرار ، خضر والمياه وبواقع خمس عينات لكل من النماذج .

الأوساط الغذائية: استعمل وسط اكار اساس الدم Blood agar base بدون استعمال الدم لعمليات الزرع المختلفة (٧) .

محاليل التخفيف : استعمل ماء البيبتون ١,. % (٨) .

طرائق الزراعة : استعملت الطرق التالية بعد إجراء التخافيف الملائمة :

١- طريقة الصب بالأطباق Pour plate method (PP) (٩) .

٢- طريقة الزراعة القياسية Standard plate count (SPC)حيث زرعت النماذج على سطح أوساط غذائية صلبة (٩) .

٣- طريقة القطرة Drop method (DM) تم اخذ قطره من النموذج (٢٠ مايكروليتر) باستعمال الماصة الاوتماتيكية وزرع على سطح الوسط الغذائي بأكثر من مكرر ، اذ يمكن وضع ٦-٨ قطرات لكل طبق (١١،١٠) .

٤- استعملت العروة الخاصة (BM - loop) وقد استخدمت هذه العروة المصنعة محليا (٦)لزراعة النماذج على سطح الوسط الغذائي وبمعدل ٦-٨ نموذج لكل طبق .

استعملت أطباق زجاجية معقمه بقطر ٩ سم تحوي على ٢٠ مللتر من الوسط الغذائي الصلب ماعدا

---

* دكتوراه-أستاذ مساعد-معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا-جامعة بغداد

طريقة الصب بالأطباق اذ خلط الوسط الغذائي مع النموذج .
تم حضن الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٨ –٢٤ ساعة وتم حساب المستعمرات النامية في الأطباق الحاوية على ٣٠–٣٠٠ مستعمره في الطبق بالنسبة للطرق العادية . وعدت المستعمرات ١–٢٠ للبقعة في حالة طريقة القطرة او طريقة استعمال عروة BM.
التحليل الاحصائي: تم حساب المعدلات والانحرافات القياسية للأعداد الناتجة باستخدام الطرائق المختلفة . بالاضافة الى حساب معامل الارتباط (r) بين الطرائق المختلفة وطريقة استعمال عروة BM.

النتائج والمناقشة

يوضح جدول ١ الإعداد المحسوبة للنماذج المختلفة باستعمال الطرائق الأربع

جدول ١ : معدلات إعداد الأحياء المجهرية في النماذج المختلفة وباستعمال الطرائق الأربع

النموذج	BM*	DM*	SPC*	PP*
اللحوم				
العدد	$^{٨}١٠ \times ١,٥٤$	$^{٨}١٠ \times ١,٤١$	$^{٨}١٠ \times ٣,٥٠$	$^{٨}١٠ \times ٠,٨٧$
اللوغارتيم	٨,١٩	٨,١٧	٨,٥٥	٧,٩٤
منتجات الالبان				
العدد	$^{٧}١٠ \times ٤,٠٨$	$^{٧}١٠ \times ٤,٤٥$	$^{٧}١٠ \times ٣,٨١$	$^{٧}١٠ \times ٣,٧٥$
اللوغارتيم	٧,٦١	٧,٦٥	٧,٥٨	٧,٥٦
الفواكه				
العدد	$^{٧}١٠ \times ٤,٠٩$	$^{٧}١٠ \times ٤,٢٥$	$^{٧}١٠ \times ٣,٩٨$	$^{٧}١٠ \times ٣,٥٥$
اللوغارتيم	٧,٦١	٧,٣٦	٧,٦٠	٧,٥٥
الترب				
العدد	$^{٥}١٠ \times ١٠,٥$	$^{٥}١٠ \times ٥,٨٥$	$^{٥}١٠ \times ٢,٨٢$	$^{٥}١٠ \times ٣,١٠$
اللوغارتيم	٥,٠٢	٤,٧٧	٤,٤٥	٤,٤٩
نماذج الادرار				
العدد	$^{٥}١٠ \times ١,٠٠$	$^{٥}١٠ \times ٠,٧٥$	$^{٥}١٠ \times ١,٧٠$	$^{٥}١٠ \times ١,٩٧$
اللوغارتيم	٥,٠٠	٤,٨٨	٥,٢٣	٥,٣٠
الخضر				
العدد	$^{٧}١٠ \times ٤,٨٩$	$^{٧}١٠ \times ٦,٠٣$	$^{٧}١٠ \times ٣,٠٤$	$^{٧}١٠ \times ٣,٧٣$
اللوغارتيم	٧,٦٩	٧,٧٨	٧,٤٨	٧,٥٧
المياه				
العدد	$^{٥}١٠ \times ١٠,١$	$^{٥}١٠ \times ٩,٥٧$	$^{٥}١٠ \times ٧,٦١$	$^{٥}١٠ \times ٧,٠٨$
اللوغارتيم	٦,٠٠	٥,٩٨	٥,٨٨	٥,٩١

- BMالعروة الخاصة
- PP Pour plate method
- SPC Standard plate count
- DM Drop method

اما جدول ٢ فيوضح مدى قيم لوغارتيم الاعداد الحية للنماذج المختلفة وبالطرائق الأربع

جدول ٢ :مدى قيم اللوغاريتمات بالطرائق المختلفة للنماذج المختلفة

النموذج	عدد النماذج	BM	DM	SPC	PP
اللحوم	٥	٨,٤٩– ٥,٩	٨,٤٩– ٥,٧٨	٨,١٤– ٥,٧٨	٨,١٦– ٥,٨٠
منتجات الألبان	٥	٨,١١– ٥,٠٧	٨,١٤– ٥,١٢	٨,١٥– ٤,٩٤	٨,١٣– ٤,٨٢
فواكه	٥	٨,٠٢–٦,٠٤	٨,٠٦–٦,٠٣	٨,٠٦–٦,٠٣	٨,٠١–٥,٩٢
ترب	٥	٤,٩٥–٤,٠٧	٤,٨٩–٤,١٨	٤,٨١–٤,٨٣	٤,٨٢–٣,٨٢
ادرار	٥	٥,٦–٢,١	٥,٥٨–٢,١٠	٥,٩٣–٢,٠١	٥,٩٩–٢,٠٠
خضر	٥	٨,٤٢–٥,٠	٨,٣–٥,٣٣	٨,١–٥,١٥	٨,١٩–٥,٢٣
مياه	٥	٦,٢٥–٣,٨	٦,٢–٣,٤١	٦,١٨–٣,٠٤	٦,١٨–٣,٢٥

ويوضح الجدول ٣ متوسطات لوغاريتم الأعداد الحية والانحرافات القياسية لها

جدول ٣ : متوسطات لوغاريتمات الأعداد والانحراف القياسي

النموذج	المتوسط والانحراف القياسي
اللحوم	
BM	٧,١٢٦٠±١,١٣٦٩
DM	٧,٠٥٢٠±١,١٦٧٩
SPC	٦,٩٣٨٠±١,٠٧٧٩
PP	٧,٠٢٨٠±١,٠٩٢٤
منتجات الألبان	
BM	٦,٨٦٢٠±١,٢٥٢١
DM	٦,٩٦٦٠±١,٢٠٨٥
SPC	٦,٧٨٤٠±١,٢٨٨٦
PP	٦,٧٨٢٠±١,٢٥٣٦
الفواكه	
BM	٦,٨٦٢٠±١,٢٥٢١
DM	٦,٩٦٦٠±١,٢٠٨٥
SPC	٦,٧٨٢٠±١,٢٥٣٦
PP	٦,٧٨٤٠±١,٢٨٨٦
الترب	
BM	٤,٦٢٢٠±٠,٣٥٨٦
DM	٤,٥٧٢٠±٠,٢٩٣٠
SPC	٤,٤١٦٠±٠,٣٩٨٥
PP	٤,٤٢٦٠±٠,٤٥٤٠
الادرار	
BM	٣,٠٧٢٠±١,٤٤٩٤
DM	٣,٠٥٦٠±١,٤٦٢٨
SPC	٣,١٤٠٠ ±١,٥٨٧٢
PP	٣,١٤٢٠ ±١,٦١٨٤
الخضر	
BM	٦,٦٥٤٠±١,١٨١٦
DM	٦,٧٢٨٠ ±١,٢٢٧٩
SPC	٦,٥٧٦٠±١,١٩٤٤
PP	٦,٦٩٢٠ ±١,١٧٦٦
المياه	
BM	٤,٧٩٦٠±١,٣٣٥١
DM	٤,٧٧٨٠ ±١,٣١٤٥
SPC	٤,٦١٦٠ ±١,٤٢٩٦
PP	٤,٦٩٦٠±١,٣٩٦٦

ويلاحظ من الجدول ان الفروق بين الاعداد المسجله لا تشكل فروقا معنوية نظرا لان الفروق لم تتجاوز نصف دورة لوغارتميه (٢) .

وقد كان معامل الارتباط (r) بين نتائج استعمال العروة BM وكل من الطرائق المستعملة للنماذج المختلفة معنوية جدا ($P < ٠,٠١$) كما تشير نتائج جدول ٤

جدول ٤ : معاملات الارتباط لكل من نتائج BM والطرائق الأخرى من النماذج المستعملة

الطريقة	عدد النماذج	معامل الارتباط (r)	R^2	المعنوية
اللحوم				
BM & DM	٥	٠,٩٩٨	٩٩,٦٨	٠,٠٠٠
BM & PP	٥	٠,٩٨٤	٩٦,٧٨	٠,٠٠٢
BM & SPC	٥	٠,٩٩١	٩٨,١٤	٠,٠٠١
صمامات الالبان				
BM & DM	٥	٠,٩٩٥	٩٨,٩٦٩	٠,٠٠٠
BM & PP	٥	٠,٩٩٤	٩٨,٣١	٠,٠٠٠
BM & SPC	٥	٠,٩٩٢	٩٨,٨٩	٠,٠٠١
العراك				
BM & DM	٥	٠,٩٩٥	٨٥,٢٦	٠,٠٠٠
BM & PP	٥	٠,٩٩٢	٩٩,٢٧	٠,٠٠١
BM & SPC	٥	٠,٩٩٤	٩٧,١٠	٠,٠٠٠
الترب				
BM & DM	٥	٠,٩٧٦	٩٥,٢٤	٠,٠٠٤
BM & PP	٥	٠,٩٥٥	٩٧,٢٩	٠,٠١١
BM & SPC	٥	٠,٩٨٦	٩١,١٨	٠,٠٠٢
الادوار				
BM & DM	٥	٠,٩٩٩	٩٩,٧٠	٠,٠٠٠
BM & PP	٥	٠,٩٩٠	٩٧,٩٦	٠,٠٠١
BM & SPC	٥	٠,٩٨٤	٩٦,٨٠	٠,٠٠٢
الحصر				
BM & DM	٥	٠,٩٦٤	٩٢,٩٠	٠,٠٠٨
BM & PP	٥	٠,٩٣٢	٨٦,٩٤	٠,٠٢١
BM & SPC	٥	٠,٩٥٩	٩١,٩٠	٠,٠١٠
الماء				
BM & DM	٥	٠,٩٩٦	٩٩,٢٧	٠,٠٠٠
BM & PP	٥	٠,٩٧٩	٩٥,٩٢	٠,٠٠٤
BM & SPC	٥	٠,٩٩٣	٩٨,٥٨	٠,٠٠١

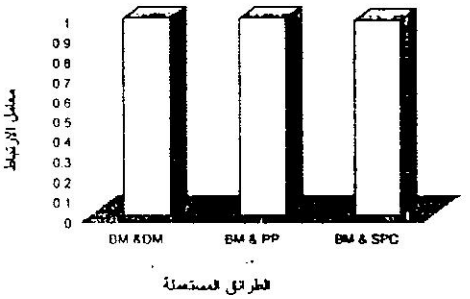
اما الشكل ١ فيوضح مجمل معدلات قيم (r) النماذج المستعملة (٣٥ نموذج) ولكل حالة من حالات الارتباط بين لوغاريتم الأعداد الناتجة باستعمال العروة BM والطرائق الأخرى . ويتضح ان قيم الارتباط متقاربة ولا توجد فروق معنوية جدا .اما مدى تطابق قيم لوغارتيم الأعداد الدنيا والعليا التي تم الحصول عليها لكافة النماذج فموضحة في الشكل ٢

وتشير النتائج الإحصائية انه لا توجد فروق معنوية بين طريقة استعمال عروة BM والطرق القياسية مثل طريقة الصب بالأطباق او طريقة النشر على السطح ، وكذلك مع طريقة استعمال القطرة .

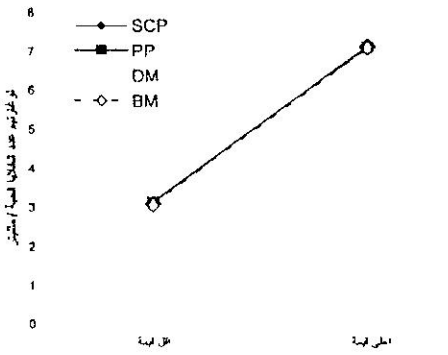
يوضح الشكل ٣ إحدى التطبيقات لاستعمال العروة BM والطرق الأخرى في قياس عدد الأحياء المجهرية (البكتريا) في نماذج الإدرار لأشخاص مصابين وأصحاء .ويلاحظ من الشكل ان القراءات تكاد تكون متشابهة والحقيقة ان مثل هذا الفحص الضروري لا يجرى نظرا للكلفة العالية وكذلك تجنبا للتلوث والأضرار التي تصيب العاملين فيما اذا استخدمت الطرق القياسية (٧) و باستعمال عروة BM تكاد تكون مثالية لمثل هذا الفحص . ان استعمال عروة BM يوفر جدوى اقتصادية كبيرة كما موضح في الأشكال ٤ ، ٥ ، ٦ الخاصة باستعمال الأوساط الغذائية ، الأطباق المستعملة ومواد التخفيف على التوالي وذلك بمقارنتها باستعمال بالطرق القياسية سواء الصب بالأطباق او النشر على السطح وبذا يتضح أن مجمل الكلفة في النموذج الواحد للطرق القياسية يصل الى حوالي ٥٩١١ دينار عراقي في حين يكلف عند استعمال عروة BM ٧٥٥,٥دينار عراقي أي تقليص بالكلفة يصل الى ٨٧,٢٢ % . اما كلفة تصنيع العروة BM فهي بحدود ٢٥ دينار عراقي مقارنة بكلفة الماصة الالية (Micro-pipette) البالغة ١٦٠-١٨٠ الف دينار عراقي والتي تستعمل بطريقة القطرة .

ولعل اهم مسوغات استعمال عروة BM هو السيطرة على التلوث حيث تستعمل بنفس طريقة العروة الاعتيادية المستعملة في مختبرات البكتريولوجي حيث أنها لا تؤدي الى تكوين الهباء (Aerosol) بالإضافة الى قلة المعدات المستعملة والذي يؤدي الى تقليل التلوث وبالتالي الى انخفاض تكاليف التخلص من التلوث. كما يمكن ان تستخدم العروة BM في تحديد MIC (Mini-mal inhibitory concentration) للمضادات الحيوية بالإضافة الى إمكانية استعمالها في اختبارات الأوساط الانتخابية لمختبرات السيطرة النوعية في معامل ألاغذيه وغيرها من الصناعات التي تحتاج الى السيطرة النوعية الميكروبية مثل الصناعات الصيدلانية وغيرها .ومما يرجح استعمال عروة BM على استعمال طريقة القطرة في الماصة الالية او العروة الاعتيادية هو عدم حصول تغير في الشد السطحي نظرا لأنها مكونة من لفة واحدة (١٢) على عكس عروة BM المكونة من ثلاث لفات وبذلك لا تتأثر بالشد السطحي ويثبت حجم القطرة التي تحملها (٦) كما يسمح باستعمال عروة BM استغلال الأطباق التي فيها تلوث محدد بازالتها او تركها واستغلال المناطق الأخرى (٧) كما انها تكون اكثر ملائمة من طريقة استعمال الناشر Spreader في حالة استعمال الأوساط الغذائية ذات الاس الهيدروجيني المنخفض والتي تكون هشة (٢). وتوفر العروة طريقة ملائمة للكشف عن الأحياء المحورة وراثيا المنتجة لمواد معينة حين لا تجدي طريقة التخفيف ويحتاج الإنتاج الى

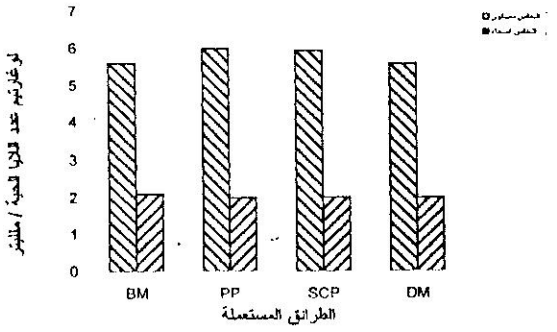
كثافةعالية من الخلايا لإظهار الصفة لذلك تكـــون ملائمة في تجارب الهندسة الوراثة خاصـــة فـــي المراحل النهائية .



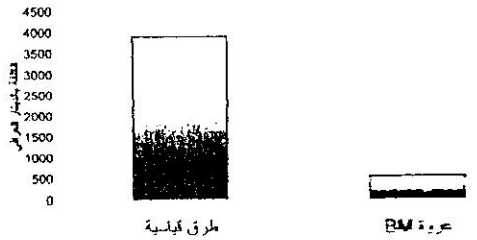
شكل ١ : معدلات قيم معامل الارتباط للنماذج المستعملة ولكل حالة من حالات الارتباط



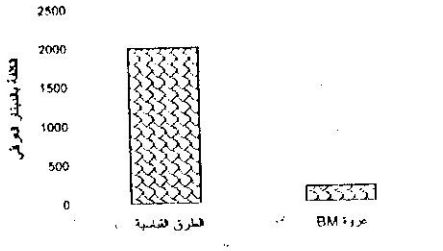
شكل ٢ : تطبيق قراءات لوغاريتمات القيم الدنيا والقيم العليا باستعمال الطرائق الاربع (٣٥ نموذج)



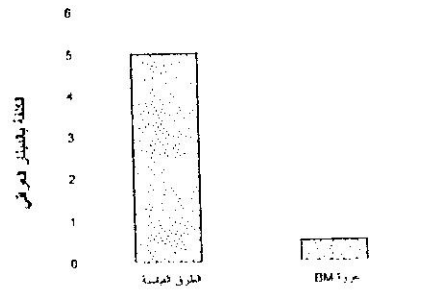
شكل ٣ : تتابع عدد الخلايا الحية في ادرار اشخاص اصحاء ومصابون باستعمال طرائق مختلفة



شكل ٤ : قيم الكثافة المتوسط للخلايا المستعملة بالطرائق القياسية وعروة BM لتحديد العدد العيوشي للنموذج الواحد



شكل ٥ : قيم الكثافة للطرائق المستعملة وعروة BM للنموذج الواحد



شكل ٦ : قيم الكثافة لعدد التخفيف بالطرائق القياسية وعروة BM .

References

1. Ingarham ,J.L ., and Ingraham , C.A. 2000 . Introduction to Microbiology . Brooks , Cole :Canada & USA.
2. Jarvis , B., Luch , V. H., and Wood . J.M.1977 .Evaluation of the spiral plate marker for enumeration of microorganisms in food . J.Appl. Bact. 43:149 –157 .
3. Wilson , M . and Lindow , S.E. 1992 . Relationship of total viable culturable cell in epiphyte population of *Pseudomonas syringae* .Appl .Environm. Microbiol. 58 : 3908 - 3913 .
4. Singleton , P. 1998 . Bacteria in Biology , Biotecnology and Medicine . John Wiley & Sons : Chichester & New York .
5. Perry , J.J., and Staley . J. T. 1997 . Microbiology . Saunders College Puplishing : Philladelphia ,USA .
٦. الخفاجي، زهرة محمود ، مها طارق نـاجي ، ثريا صادق جعفر ، ثريا خليـــل ابراهيـــم ، بشير محمود ناصر .٢٠٠٠ بحـــث موثـــق مركز الربيع للبحوث الزراعيـــة والغذائيـــة .هيئة البحث والتطويـــر الصنـــاعي. وزارة الصناعة و المعادن / جمهورية العراق .

7. Hedges . A .J ,Sannon , R., and Hopps, R.P.1978.Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the Miles & Misra method . J.Appl. Bact. 45: 57-65 .
8. Harris , R.F., and Sommers , L. E . 1967 . Plate - dilution frequency technique for assay of microbial ecology . J . Am. Soci. Microbiol . 16 : 330 -334 .
9. Harrigan . W. F. and McCance , M. E. 1976 . Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology . Academic Press: London and New York .
10. Atlas, R.M. 1995. Experimental Microbiology . Mosby. Year Book . USA .
11. Olds , J. 1975 , a Color Atlas of Microbiology .Wolfe Publishing Ltd.: Holland
12. Bull ,A.T ., Ward , A. C. and Goodfellow , M. 2000 .Search and discovery strategies for biotechnology : Paradigm shift .Microbiol. Mol, Biol, Rew. 64 :573 – 606 .
13. Hogan, . A. J. and Smith, K. L. 1997. Bacterial count sawdust bedding. J. Dairy Sci . 80 : 1600 – 1650 .

Using of Special Loop for Determination of Bacterial Viable Count in Different Samples

Mustafa S. Al-Salmani and Zahra M. Al-Khafaji

Genetic Engineering & Biotechnology Institute for Postgraduate Studies-Baghdad Uiversity-Iraq

Abstract

Determination of microbial viable count in different samples (35 sample) was carried out using special loop (BM loop) , Results of BM loop , standard plate count , pour plate method and drop method were compared . The results revealed high identity and the correlation coefficient (r) was 0.975 –0.986 . Using BM loop reduced 87.22 % of the total costs per sample, in addition to reduction in labor . The preferences of using BM to overcome other problems such as contamination were discussed.