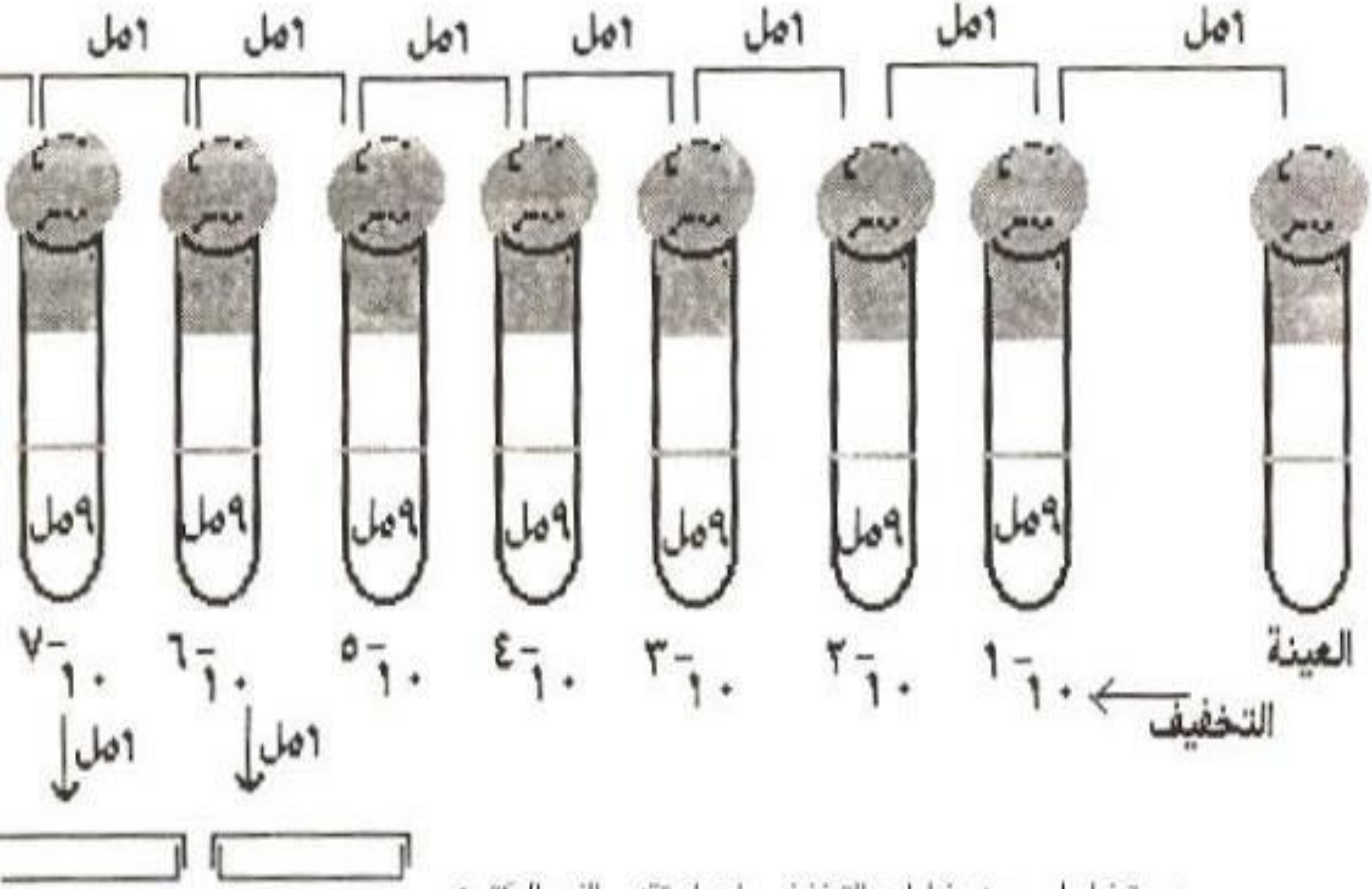
بسم الله الرحمن الرحيم

الطرق السريعة و المحسنة لعزل و تعريف وعد والكشف عن الكائنات الحية الدقيقة و منتجاتها في الأغذية .

- من المعروف أن الكائنات الحية الدقيقة التي تستوطن هذة البيئة التي نعيش فيها، على درجة كبيرة من التعقيد من حيث اختلاف أنواعها إضافة إلى أعدادها الهائلة، اذ يقدر عدد أنواع الميكروبات التي تستوطن مختلف أجزاء جسم الإنسان مثل سطح الجلد، الفم، الأمعاء...الخ بعدة مئات. وينتشر كل نوع من هذة الأنواع بأعداد كبيرة جدا تصل للآلاف فعلى سبيل المثال عندما يعطس الفرد منا، فانه يطلق مع الرذاذ المتطاير بضعة الآلف من الخلايا البكترية، كما أن جراما واحدا من الفضلات الآدمية (البراز) يحتوي على مئات الآلاف من خلايا البكتريا. وبخلاف جسم الإنسان فان مكونات البيئة التي نعيش فيها مثل الماء،و الهواء، والتربة تعج بأعداد هائلة جدا من مختلف أنواع هذة الميكروبات . ويرجع انتشارها الكبير إلى صغر حجمها المتناهي مما يسهل حملها بالتيارات الهوائية مع جزيئات البيئة الموجودة فيها.

- ولدراسة هذة الكائنات الحية الدقيقة دراسة وافية لابد من عزلها وتنميتها في المعمل على مواد مغذية (بيئات غذائية) تتوافر فيها جميع العناصر الضرورية لنموها.



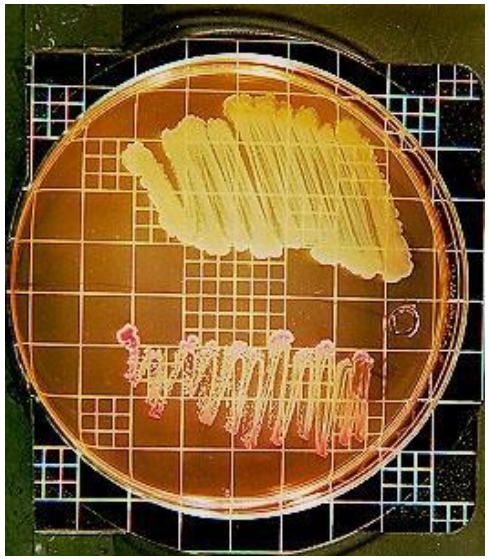
رسم تخطيطي يبين خطوات التخفيف وإجراء تقدير النمو البكتيري

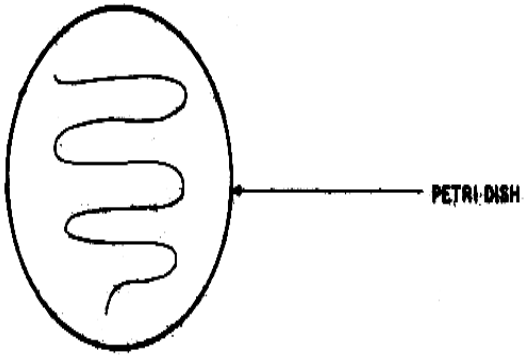
عزل البكتريا في مزارع نقية

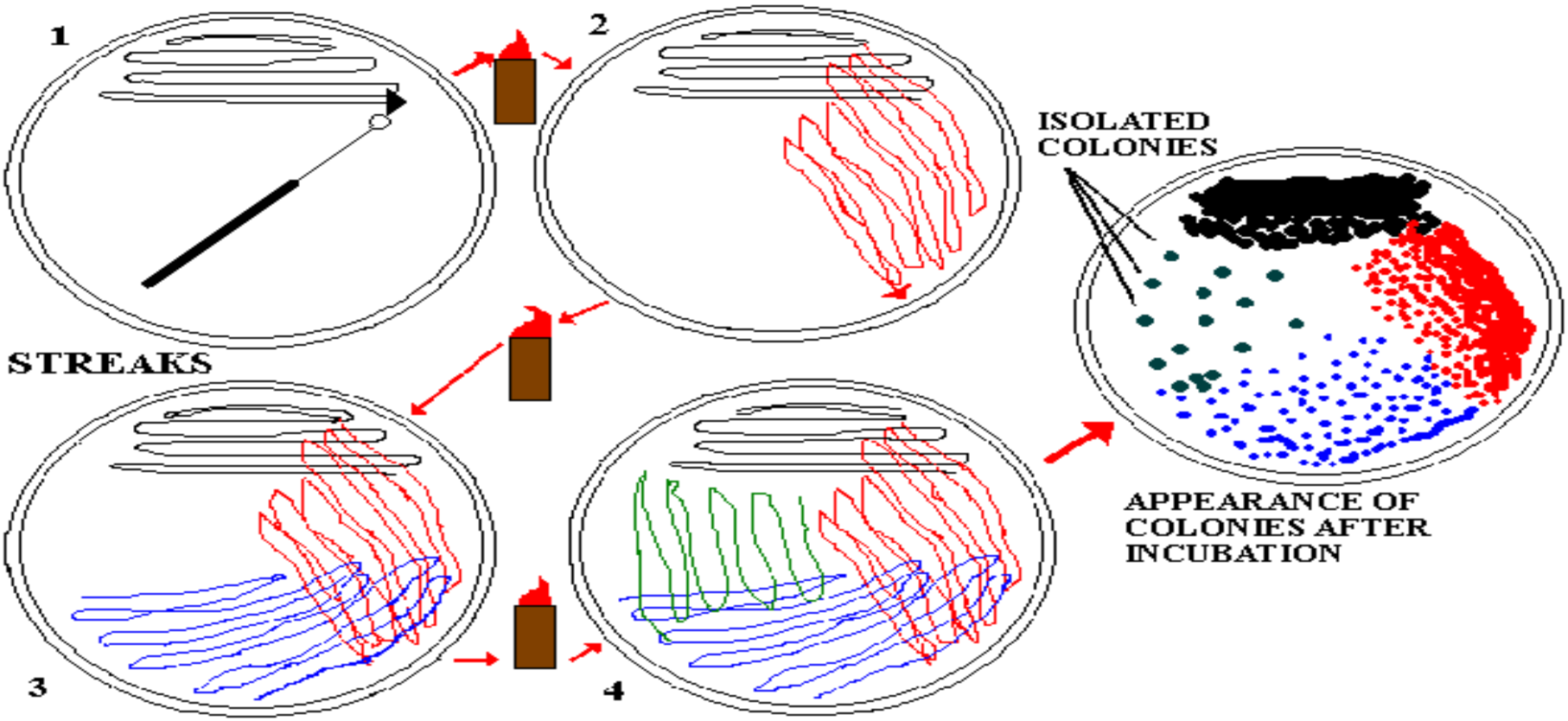
توجد طريقتين رئيسيتين يمكن بواسطتها الحصول على مزرعة نقية من أخرى مختلطة وهما:

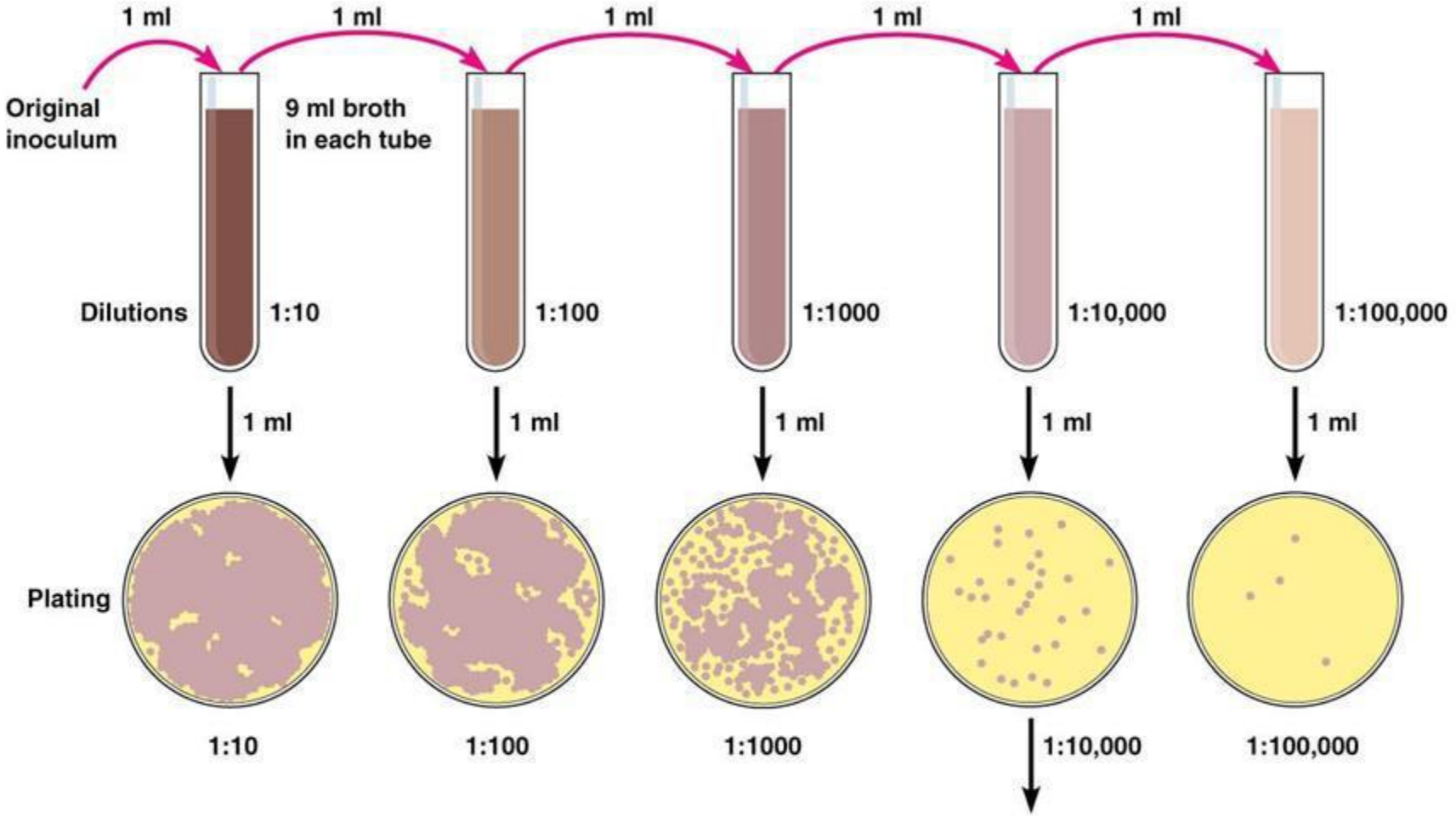
أولا: طريقة الأطباق المخطوطة Streak-plate method

ثانيا: طريقة الأطباق المصبوفة Pour plate method




PETRI DISH


1
2
STREAKS
3
4
ISOLATED COLONIES
APPEARANCE OF COLONIES AFTER INCUBATION



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.

Figure 6.15

تقدير الحمل الميكروبى فى المنشآت الغذائيه

يتوقف عدد ونوع الكائنات الحية في أي منتج غذائي على عدة عوامل:

- الظروف الطبيعية والبيئة المحيطة بمكان انتاج أو الحصول على الغذاء.
- درجة وجودة المادة الغذائية الميكروبيولوجية الخام او غير المصنعة .
- الظروف والشروط الصحية المتبعة أثناء التداول وتصنيع الأغذية .
- كفاءة عمليات التعبئة والتداول والنقل والتخزين.

تقدير الحمل الميكروبى فى المنشأت الغذائية

- 1- المسحات من بيئة العمل (الأسطح)

a) المسحات Swap contact method

b) مسحات اسفنجية للسطح surface sponges swabs

c) أطباق التلامس المباشر

d) طريقة الشرائط اللاصقة

e) طريقة التفريغ

2- تقدير اعداد الميكروبات على اسطح عبوات الأغذية

تستخدم عدة طرق لتقدير نمو الكائنات الدقيقة وذلك لاستخدامها في كثير من الدراسات التطبيقية كمعرفة عدد خلايا البكتيريا Cell numbersفي المواد الغذائية لتحديد مدى صلاحيتها للإستخدام أو لإنتاج مواد معينة من الكائنات الدقيقة كالتقدير الحيوي للفيتامينات والأحماض الأمينية أو بحساب كتلة الخلايا Cell massesللقيام 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 :

1- التقدير المباشر لعدد الخلايا cell numbers .

2- التقدير غير المباشر لعدد الخلايا .

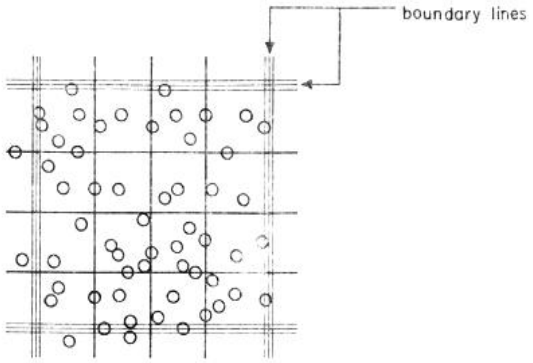
3- تقدير الوزن الجاف للخلايا .

4- تقدير النيتروجين الكلي في الخلايا .

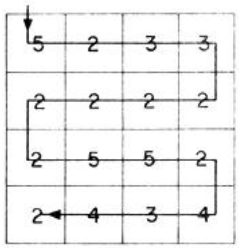
5- تقدير درجة التعكير (منحنى النمو) .

6- تقدير درجة إنتاج الحمض .

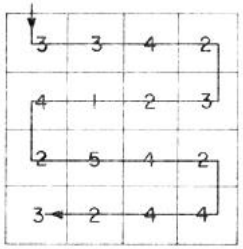
أولا :التقديرالمباشر لعدد الخلايا Cell count



- أ - استعمال شرائح عد كريات الدم :
- ب- استعمال شرائح زجاجية عادية



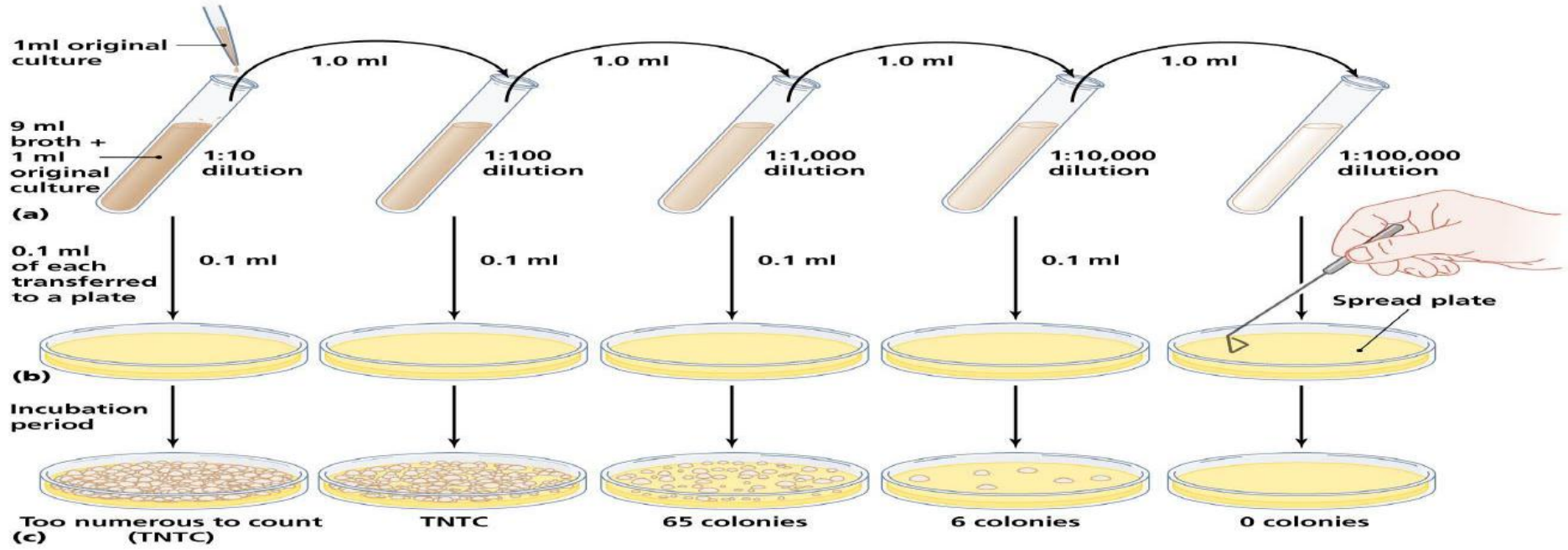
Left and bottom



Top and right

ثانيا : 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 .



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

ثالثا : تقدير الوزن الجاف للخلايا

بعض الدراسات تحتاج لتقدير الوزن الجاف للخلايا سواءاً للفطر أو البكتيريا باعتبار أن 90% 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 .

رابعاً : تقدير درجة التعكير turbidimetry estimation

تقدير النمو البكتيري بالتعكير (منحنى النمو : (Groth 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 Precentage of transmission أو الإمتصاص . Absorbance

ويستعمل لهذا الغرض جهاز يسمى المطياف Spectrophotometreوهذه 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 phaseللتأقلم مع الوسط الغذائي والظروف المحيطة بها ثم تمر في مرحلة النمو اللوغاريتمي Exponential phaseتكون 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 phaseويتم في هذه المراحل تتبع عدد الخلايا للتعرف على طبيعة منحنى النمو في الخلايا البكتيرية .

خامساً : 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 14% من الوزن الجاف وقد تختلف هذه النسبة حسب نوع الميكروب أو حسب اختلاف الظروف البيئية بالنسبة للنوع الواحد.

سادساً: 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 المليمترات من الهيدروكسيد المستعملة وهي تتناسب طردياً مع درجة الحموضة في المزرعة المختبرة
.

التقديرات الميكروبيولوجية فى الأغذية والمستخدمة لتعيين الحدود الميكروبيولوجية

- 1- الأعداد الكلية للميكروبات الهوائية (Aerobic colony count) وتشتمل على اعداد كل من البكتريا والفطريات والخمائر.
- 2- الدلائل الميكروبية (Indicator organisms) واهمها E.coli
- 3- بكتريا التسمم الغذائى المتخصصة specific food poisoning pathogens
- 4- ميكروبات الفساد Spoilage microrganisms

طرق السيطرة على الأحياء الدقيقة فى الأغذية

ان الهدف الرئيسى من السيطرة على الأحياء الدقيقة فى الأغذية هو منع أو تأخير فسادها والحد من المخاطر الصحية الناجمة عن تناول الغذاء (السيطرة على الأحياء الدقيقة الممرضة).

يمكن تقسيم السيطرة على الأحياء الدقيقة الى أربع مجموعات:

- تقليل أومنع وصول الأحياء الدقيقة الى الغذاء (تقليل أو منع تلوث الأغذية بالأحياء الدقيقة).
- إزالة الأحياء الدقيقة من الغذاء.
- تأخير وإعاقة نمو الأحياء الدقيقة.
- قتل أو تحطيم الأحياء الدقيقة.

أولاً: تقليل أومنع وصول الأحياء الدقيقة الى الغذاء

تبدأعملية السيطرة على الأحياء الدقيقة بالعمل على تقليل وصول الأحياء الدقيقة للأغذية، حيث ان منع وصول الأحياء الدقيقة للغذاء يعتبر مستحيلاً. ويتم ذلك بداية من حصاد الأغذية وذلك باستخدام التقنيات المناسبة ومراعاة النظافة وإتباع الإجراءات والعادات الصحية السليمة فى حصاد وتعبئة ونقل وتخزين الأغذية وكذلك فى عرضها للبيع أو أثناء تداولها داخل المصانع بداية من الإستلام حتى انتهاء التصنيع، كذلك تداول المستهلك لها سواء كانت مصنعة او غير مصنعة. وبناء على ذلك يجب على كل من يتعامل مع الغذاء ان يعمل على تقليل تلوث الغذاء (حيث لوحظ ان معظم حالات انتشار الأمراض تكون ناشئة من التداول الخاطىء وتلوث الغذاء فى اماكن تقديم الطعام او فى المنازل) كل ذلك يهدف الى تقليل الحمل الميكروبى للأغذية حيث انه كلما قل الحمل الميكروبى كلما انخفض احتمال وجود الأحياء الدقيقة غير المرغوبة (المسببة للفساد والممرضة). ويكون العمر الحفظى Shelf-life للغذاء أطول وفى نفس الوقت يسهل السيطرة على الأحياء الدقيقة التى وصلت الغذاء.

ثانياً: إزالة الأحياء الدقيقة من الغذاء:

تتمثل عملية إزالة الأحياء الدقيقة من الأغذية على المستوى التجارى فى عمليات الغسيل والطرد المركزى والترشيح. يستخدم الغسيل كخطوة من خطوات تجهيز الكثير من الأغذية بغرض إزالة الأحياء الدقيقة من الغذاء وأجزاء التربة العالقة بالغذاء وبقايا المبيدات، كذلك يستخدم الطرد المركزى كأحدى خطوات التصنيع فى صناعة السكر وترويق بعض عصائر الفاكهه. أما إزالة الميكروبات كهدف رئيسى فيتمثل فى إستخدام الترشيح فى بعض الأغذية وأحيانا يطلق على هذه العملية أسم البسترة الباردة Cold pasteurization وهذه لها استخدامات محدودة مثل ترشيح المياة وبعض عصائر الفاكهه والخل والمياة الغازية والزيوت النباتية. ولا تؤثر هذه الطريقة على الإنزيمات.

ثالثاَ: تأخير وإعاقة نمو الأحياء الدقيقة
Retarding growth

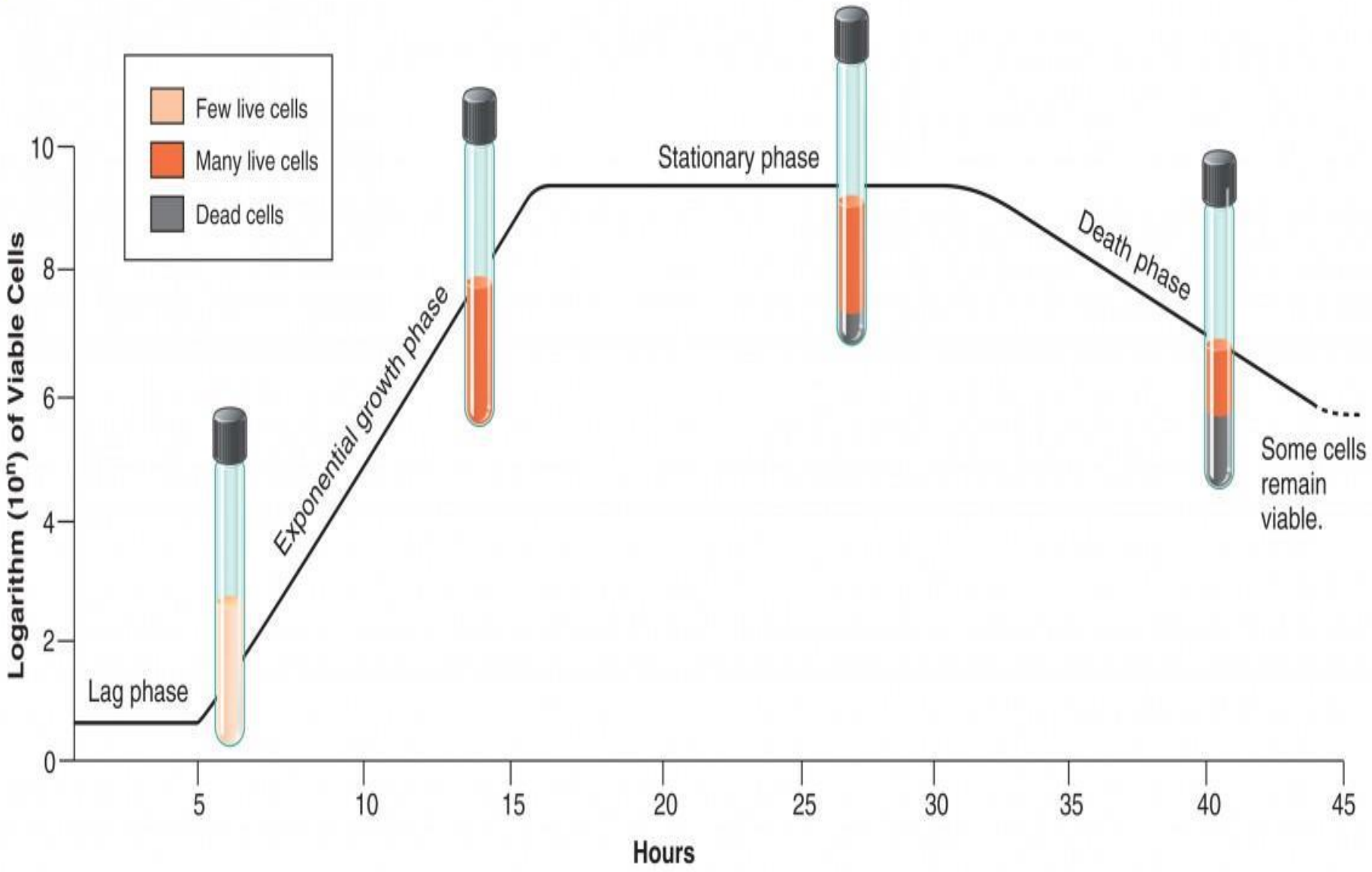
نجد ان معظم طرق حفظ الأغذية تعتمد على تأخير بداية النموالميكروبى وإعاقة النمو بمجرد أن يبدأ وذلك عن طريق التأثير على بعض العوامل مثل:

- خفض درجة الحرارة ويتمثل فى حفظ الأغذية بالتبريد والتجميد.
- خفض النشاط المائى مثل حفظ الأغذية بالتجفيف والتجميد والتجميد والتمليح والتسكير.
- تغيير التركيب الكيماوى للغذاء مثل حفظ الأغذية بإستخدام المواد الحافظة.

منحنى النمو Growth curve

عندما تتوفر الظروف المثالية لنمو الكائن الحى الدقيق فإنه يتكاثر ويمر خلال عدة مراحل تسمى اطوراً فإذا رسمنا العلاقة بين لوغاريتم عدد الوحدات المكونة لمستعمرة Colony forming unit (CFU)/مل او جم من الغذاء مع الزمن (عند ثبات باقى العوامل من pH، A_w) لحصلنا على منخنى النمو. فإذا لقحت خلية بكتيرية واحدة في وسط غذائي وحضنت على درجة الحرارة المثالية للنمو فان الخلية تبدي خواص منحني النمو الذي يتكون من أربعة اطوار:-

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.



Total cells in population, live and dead, at each phase.

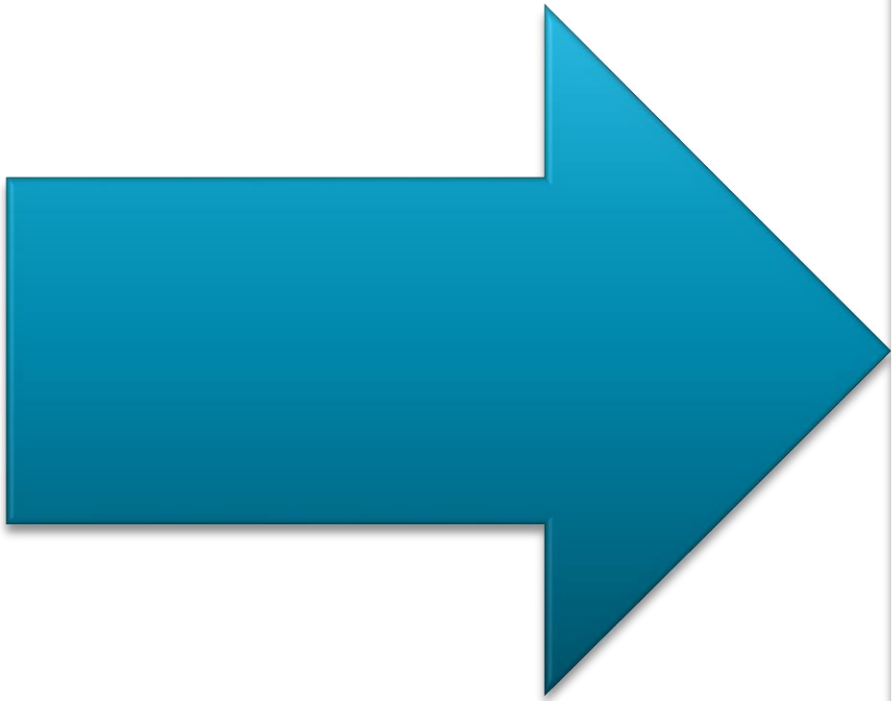
طور الركود أو السكون Lag phase

لاتزداد أعداد الخلايا في هذا الطور ولكن تبقى ثابتة مؤقتا ولكنها ليست في حالة ثبات لكونها في حالة من الأستعداد للنمو والعمل على تخليق الأحماض النووية والانزيمات ومرافقات الانزيمات حيث لايرافقه زيادة في عدد الخلايا

طور النمو اللوغارتمي
Exponential or logarithmic phase

يزداد عدد الخلايا زيادة اسية وبمعدل عالى تحت الظروف المثالية من درجة الحرارة وتوفر الغذاء وتكون الخلايا البكتيرية في هذا الطور متماثلة من حيث التركيب الكيميائي والفعالية الحيوية.
لذا نستخدم هذا الطور لإجراء الإختبارات الميكروبيولوجية

طور النمو الثابت
Stationary phase



يتباطأ معدل تكاثر الخلايا في هذا الطور الا أن خط النمو يبقى مستقيما، و ليس هناك زيادة في معدل النمو.

ويرجع ذلك الى قرب نفاذ المادة الغذائية واحتمالية انتاج مواد ايضية سامة نتيجة النمو فيتوقف الانقسام نتيجة لماسبق ويتساوى معدل الموت مع معدل النمو.

Death phase طور الموت

في هذا الطور يكون معدل موت الخلايا أعلى من معدل انتاج خلايا جديدة وهذه الحالة تعود الى نفاذ المواد الغذائية الأساسية من الوسط وتراكم المواد السامة المثبطة للنمو وفي نهاية هذا الطور يقل معدل موت الخلايا وسبب ذلك يعود الى قلة اعداد الخلايا الحية المتبقية مما يجعل باقي المواد الغذائية في الوسط يكفي لاستمرار نشاطها وتصبح الخلايا الميتة في الوسط مصدرا غذائيا جديدا للخلايا الحية

الأهمية التطبيقية لمنحنى النمو

يعتبر ذا اهمية قصوى في التعامل مع البكتريا بالذات في مجالات مقاومة البكتريا، الإصابات المرضية، فساد الأغذية الميكروبي، بصفة عامة فان الخلايا عندما تكون في اوجه نشاطها فانها تكون أكثر عرضة للتأثر بالعوامل التي تؤدي الى تعطيل عمليات التمثيل الغذائى والتكاثر في الخلية ومن الناحية المرضية فان الخلايا في الطور النشط تكون اكثر احداثا للمرض مقارنة بتلك في الاطوار المتأخرة ويفضل ان تتم عمليات الصبغ لدراسة الخلايا في مرحلة الطور النشط (باستثناء صبغ الجراثيم).

رابعاً: قتل أو تحطيم الأحياء الدقيقة
Destruction of microorganisms

تعتمد بعض طرق حفظ الأغذية على تحطيم وقتل الأحياء الدقيقة وتتمثل هذه الطرق فى استخدام درجة الحرارة المرتفعة واستخدام الطاقة الأشعاعية:

- تأثير الحرارة على الخلايا الميكروبية: يرجع التأثير المميت للمعاملة الحرارية (الرطبة) على الأحياء الدقيقة بصفة رئيسية لحدوث تجمع Coagulation أو دنترة Denaturation لبروتينات وإنزيمات الخلية. بالإضافة الى ان الحرارة قد تحدث هدماً فى فى الأحماض النووية (DNA, RNA) او تلفاً damage للغشاء البلازمى. وقد فسر موت الجراثيم بالمعاملات الحرارية بأنه راجع لحدوث تغيرات طبيعية وكيماوية تتداخل مع قدرة الجرثومه على امتصاص الماء.

مقاومة الأحياء الدقيقة لدرجات الحرارة المرتفعة: يمكن تحطيم الخلايا الخضرية لكل من البكتريا والفطريات بالتسخين على درجات حرارة 60- 80 ° م لمدة قصيرة، ولكن الأحياء الدقيقة المقاومة لدرجات الحرارة العالية thermoduric والمحبة لدرجات الحرارة المرتفعة thermophilic تحتاج لمعاملة حرارية أشد من ذلك، ونلاحظ ان جميع الخلايا الخضرية تقتل إذا تعرضت لمعاملة حرارية مدتها 10 دقائق على درجة حرارة 100 ° م.

وتعتبر جراثيم البكتريا والفطريات أكثر مقاومة للمعاملات الحرارية من خلاياها الخضرية، كما ان جراثيم البكتريا أكثر مقاومة من جراثيم الفطريات فأكثرجراثيم الفطريات مقاومة للحرارة هى جراثيم الفطر *Byssochlamyes fulva* (تتحمل معاملة حرارية 5 ساعات على درجة حرارة 88 ° م.). أما جراثيم البكتريا المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة أكثر مقاومة للحرارة من جراثيم البكتريا المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة. ومن أهم المعاملات الحرارية المستخدمة فى التصنيع

البسترة Pasteurization

والتعقيم التجارى Commercial sterilization

والتسخين الأومى Ohmic heating .

الحمد لله

THANK YOU!
©WWW.GRATITUDEHABITAT.COM