DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v1i1.1377

دراسة مقارنة لقياسات الكثافة الضوئية المستخدمة فى تقدير أعداد البكتيريا

عبدالعزيز عبدالله عزوز(1) و ميرفت الطاهر بن محمود(2)

الملخص

هناك تباين واضح فى قياسات الكثافة الضوئية لمعلقات الخلايا البكتيرية بين بكتيريا الجرام السالب والموجب، وقد ترتبط هذه الاختلافات من ناحية بكيمياء الجدار الخلوى، أو بالخواص الشكلية للخلية من ناحية أخرى؛ بحيث تفوق درجة القياسات فى بكتيريا الجرام الموجب العضوية مثيلتها فى بكتيريا الجرام السالب العضوية عند تساوى الكثافة العددية، وهذا مايشير إلى أن اختلاف كيمياء الجدار الخلوى بين النوعين قد يكون أحد العوامل المؤثرة، وتنعكس النتيجة السابقة، عندما تتم المقارنة بين أجناس عضوية سالبة لتفاعل جرام وأخرى كروية موجبة لتفاعل جرام؛ مما يشير إلى تأثير الخاصية الشكلية للخلية على هذه القياسات.

أثبتت طريقة قياس الكثافة جدواها فى مجال أحياء التربة الدقيقة، حيث يمكننا الحصول على منحنيات قياسية لمعلقات التربة تمكن من متابعة التغيرات التى تطرأ على الكثافة العددية لبكتيريا التربة أثناء اجراء الدراسات المرتبطة بذلك؛ خصوصا التى قد تقام على عديد من العينات وتحتاج لمتابعة لفترات زمنية طويلة.

المقدمة:

تتعدد الطرق المتبعة لقياس كثافة الكائنات وحيدة الخلية كالبكتيريا فى مختلف البيئات. البعض من هذه الطرق يقوم على أساس تقدير الأعداد، ويكون ذلك إما بالكشف المجهرى المباشر لمعلق من العينة يوزع على سطح شريحة مقسمة إلى حجرات لتسهيل عملية العد وتعرف بالهيموسيتومتر (1). أو بالاستعاضة عن المجهر واستخدام جهاز العد الالكترونى والمعروف بعداد كولتر (2). كذلك يمكن الحصول على أعداد الخلايا البكتيرية بطرق غير مباشرة، وتعتبر طريقة الأطباق القياسية من أهمها، حيث يتم فيها عمل سلسلة من التخفيفات المتتابعة للعينة، ومن ثم نقل حجم معلوم منها إلى أطباق غذائية، تحوى البيئة المثلى للنمو وتحصر الأعداد بعد المستعمرات النامية بعد فترة تحضين مناسبة. أما فى حالة الأنواع التى لايمكنها تكوين مجموعات ميكروبية مميزة على المنابت الغذائية.. فإن تقدير أعدادها يتم بطريقة حساب العدد الاحتمالى (3).

وكبديل لتقدير الأعداد.. يمكن قياس كثافة البكتيريا فى المحاليل المختلفة؛ بتقدير كتلتها التى يمكن اجراؤها بصورة مباشرة وذلك بوزن المادة

(1) استاذ مشارك علم الأحياء الدقيقة.

(2) مهندسة زراعية - قسم التربة والمياه- كلية الزراعة / جامعة الفاتح - طرابلس.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

الخلوية فى حجم ثابت من المحلول بعد تجميع هذه الخلايا وتجفيفها. إلا أن هذه الطريقة تتطلب كثيرا من الوقت، والدقة المتناهية فى تقدير الأوزان (2). وتعتبر طريقة قياس درجة التعكير الحادث فى بيئات النمو السائلة البديل غير المباشر لها. تقوم طريقة قياس درجة التعكير على حقيقة أن الأجسام الصغيرة المعلقة فى السوائل لها مقدرة على امتصاص الضوء المار خلالها، بشكل يتناسب طرديا مع تركيزها. ويمكن قياس درجة الامتصاص للضوء، أو مايعبر عنه بالكثافة الضوئية، للمعلقات البكتيرية باستخدام جهاز قياس ضوئى (الكلوروميتر، السبكتروفوتوميتر) عند أطوال موجية تتراوح مابين 400-600 نانومتر.

عند استخدام طرق التعكير هذه لقياس النمو البكتيرى.. فإن ذلك يربط غالبا بتقديرات أخرى للاعداد باستخدام طريقة الأطباق القياسية؛ للحصول على منحنى قياسى خاص بطبيعة النمو لجنس محدد، يوضح هذا المنحنى العلاقة بين عدد الخلايا والكثافة الضوئية المقاسة لها.

وبالرغم من أن هذه المنحنيات القياسية يمكن الاستفادة منها فى عديد من المجالات؛ خصوصا فى الدراسات المرتبطة بفسيولوجيا الخلية البكتيرية، إلا أنه لم يتم تسخير هذه الطريقة فى السابق لتقدير أعداد الخلايا البكتيرية فى معلقات التربة، وتعتبر هذه الدراسة الأولى من نوعها.

تستهدف هذه الدراسة مقارنة منحنيات قياسية لعدد من أجناس البكتيريا الموجبة والسالبة لتفاعل جرام؛ لمعرفة ما اذا كان هنالك أى اختلاف بينها. كذلك تم تسخير هذه الطريقة فى محاولة لإعداد منحنيات قياسية لمعلقات من التربة تحت زراعات مختلفة؛ يمكن الرجوع إليها فى تقدير الأعداد بصورة سريعة وغير مكلفة من الناحية الاقتصادية.

طرق العمل:

أحضرت عينات التربة المستخدمة فى هذه الدراسة من محطة أبحاث كلية الزراعة بطرابلس، ومن مواقع مختلفة مزروعة لنبات الفول، مغطاة بأعشاب، ومن حقل للحمضيات. جففت العينات بتعريضها للهواء الجوى لمدة يومين، ثم غربلت بمنخل قطره 2 مم. أعدت دوارق تحوى 100 ملل من البيئة الغذائية، حساء مغذى (Nutrient-broth) وحقنت بمقدار 10 ملل من مزارع بكتيرية مختلفة تمثل الأجناس *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Proteus vulgaris.* وهى سالبة لتفاعل جرام، والأجناس *Streptococcus Pyogenes, Staphyllococcus aureus, Bacillus megaterium.* وهى موجبة لتفاعل جرام. حضنت الدوارق بعد ذلك فى درجة حرارة 35م، ولمدة 48 ساعة للحصول على درجة تعكير مناسبة ومشاهدة بالعين المجردة، كمؤشر لحدوث النمو.

لإجراء قياسات الكثافة الضوئية للنموات البكتيرية.. تم إعداد عشر أنابيب اختبار من كل جنس، وضعت هذه الأنابيب فى حمام ثلجى، واحتوت كميات مختلفة من المعلق البكتيرى 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ملل. أضيف ماء مقطر للأنابيب التسع الأولى منها للوصول بالحجم الكلى إلى 10 ملل. استخدم جهاز القياس الضوئى (السبكتروفوتوميتر) لقياس الكثافة الضوئية للمعلق فى الأنابيب السابقة عند الطول الموجى 600 نانومتر. فى نفس الوقت الذى تم فيه إعداد الأنابيب السابقة للقياس الضوئى، أجريت عملية تقدير أعداد البكتيريا فى دورق النمو الأصلى؛ باستخدام طريقة الأطباق القياسية على بيئة الآجار المغذى (Nutrient-agar).

أعدت معلقات التربة بإضافة كمية 10 جرامات من كل عينة تربة إلى دورق يحوى 90

ملل ماء مقطر ومعقم. بعد الرج الميكانيكى لمدة 15 دقيقة، لضمان تفتيت حبيبات التربة والوصول بخلايا البكتيريا إلى درجة بقائها فى المعلق المائى، وضعت الدوارق على سطح أفقى ولمدة نصف ساعة لترسيب معظم مكونات التربة المعدنية. اعتبرت هذه الدوارق بمثابة دوارق نمو المزارع البكتيرية السابقة، وتم اتباع نفس الخطوات لتقدير الأعداد والحصول على قياسات الكثافة الضوئية.

النتائج والمناقشة :

يمثل شكل (1) الكثافة الضوئية المقاسة عند الطول الموجى 600 نانومتر لخمسة أجناس من البكتيريا زراعتها فى دوارق من الحساء المغذى لمدة 48 ساعة ثلاثة من هذه الأجناس *E. coli, P. vulgaris, E. aerogenes* من البكتيريا العضوية السالبة لتفاعل جرام، بينما الجنسان الآخران *B. megaterium, S. aereas* كلاهما موجب لتفاعل جرام ويختلفان فقط فى الشكل العام للخلية، فالأولى عضوية أما الثانية فهى كروية. يمكننا من هذا الشكل استنتاج أن لنوعية تفاعل جرام تأثيراً على مستوى الكثافة الضوئية المقاسة، والتى تعكس بصورة مباشرة درجة التعكير التى تحدثها خلايا البكتيريا عند نموها فى المحاصيل الغذائية السائلة؛ بحيث يلاحظ أن سلوك الأجناس الموجبة وخصوصا العضوية منها يؤدى إلى إحداث درجة كبيرة من التعكير فى الوسط، تؤكدها القياسات العالية المتحصل عليها فى الكثافة الضوئية؛ بالمقارنة إلى الأجناس السالبة. إلا أن الصورة تنعكس عند مقارنة قراءات الكثافة الضوئية لبكتيريا الجرام السالب بمثيلتها من بكتيريا الجرام الموجب الكروية الشكل.

وللتأكيد على المشاهدة السابقة.. تم استخراج مزارع بكتيرية لها كثافة عددية موحدة للمقارنة، ويمثل شكل (2) النتائج المتحصل عليها لبكتيريا *B. megaterium, E. aerogenes*، وكلاهما عضوى الشكل، متحرك بأسواط محيطية ولهما نفس الكثافة العددية (10^9 خلية / ملليلتر) ويختلفان فقط فى تفاعلهما لتصبيغ جرام، فالأولى موجبة أما الثانية فهى سالبة. يلاحظ من هذا الشكل أنه عند تساوى جميع الخواص، يمكننا التأكيد على أن لتفاعل جرام درجة كبيرة من التأثير على الكثافة الضوئية المقاسة، بحيث تفوق بكتيريا الجرام الموجب مثيلتها من بكتيريا الجرام السالب. أما شكل (3) فيمثل المشاهدة العكسية لسلوك بكتيريا الجرام الموجب الكروية الشكل، حيث تمت فيه المقارنة بين بكتيريا *P. vulgaris* وهى عصوية سالبة لتفاعل جرام، وجنسين من البكتيريا الكروية الموجبة لتفاعل جرام وهما *S. aureus, S. pyoqenes* وقد روعى أن يكون تركيز الخلايا متجانساً 10^8 خلية / ملليلتر) ويلاحظ من قياسات الكثافة الضوئية أن البكتيريا الكروية الموجبة لتفاعل جرام، تعطى قراءات أقل من مثيلتها العصوية والسالبة بعكس الصورة السابقة.

مما سبق.. يمكننا استخلاص أن الكثافة الضوئية المقاسة لنموات البكتيريا من مزارع غذائية سائلة، التى تعكس بصورة مباشرة درجة تعكير الوسط تكون أكبر فى بكتيريا الجرام الموجب بالمقارنة ببكتيريا الجرام السالب، شريطة أن تتم هذه المقارنة بين أجناس لها خواص شكلية متجانسة. وقد يؤدى اختلاف الشكل العام للخلية إلى الحصول على نتائج عكسية.

يوضح شكل (4) النتائج المتحصل عليها من قياسات الكثافة الضوئية لمعلق ثلاث عينات من التربة لها نفس القوام، وتختلف فى طبيعة الغطاء النباتى. ويلاحظ من الشكل أن هذه القياسات متشابهة إلى حد كبير فى العينتين الأولى والثانية (أعشاب، موالح) ويعكسان كثافة عددية

لبكتيريا التربة متقاربة فى الحالتين (10^9 x 1.2,2.7 خلية / جرام تربة) على التوالى، بينما كان معدل القياسات الضوئية أكبر فى العينة الثالثة (فول) كنتيجة لزيادة أعداد البكتيريا فيها (10^9 x 5.7 خلية / جرام تربة). ويمكننا الاشارة هنا، ولأول مرة فى دراسة مقدمة من هذا النوع، الى إمكانة الاستفادة من هذه القياسات فى الحصول على منحنيات قياسية للترب المختلفة تمكن من عملية متابعة التغيرات، التى تطرأ فى كثافة أعداد البكتيريا فى التربة، خصوصا فى الأبحاث طويلة الأمد بحيث يمكن الحصول على نتائج بصورة سريعة موفرة للجهد والوقت، ولها مردود اقتصادى بما توفره من احتياج لاستهلاك كميات من المواد الكيميائية، والأدوات، والطاقة لتقدير الأعداد بطريقة الأطباق القياسية المتبعة بصورة عامة.

الخلاصة :

من هذه الدراسة يمكننا استخلاص الحقائق التالية. أولا: عند تساوى الكثافة العددية للخلايا فى المزارع النقية، لاتعطى القياسات كثافة ضوئية متساوية، إذا ماكان هناك اختلاف لتفاعل جرام أو فى الخواص الشكلية للخلية. ثانيا: اختلاف الكثافة العددية يعطى كثافة ضوئية مختلفة فى معلقات التربة. ثالثا: يمكن الحصول على كثافة ضوئية شبه متساوية لمعلقات التربة، إذا ماكانت الكثافة العددية لكتيريا التربة متقاربة.

Comparative Study of the Optical Density Measurements Used in Determination of Bacterial Counts

A.A. Azzoux, and M. T. Ben-Mahmoud

Abstract

sifferences in optical density measurements were obvious between gram-negative and gram-positive species. Both gram's reaction and cell-shape appears to account for the observed variations. with rod-shaped bacteria, gram-positive species gave a much higher values of optical density than gram-negative ones. the picture was vice versa, when comparisons were made between gram-positive cocci and gram- negative rods.

Standard curves could be established from optical density measurements of soil-suspensions. These curves might be found helpful in monitoring changes in the population of soil bacteria, particularly with projects that involve large number of samples and of a long duration.

Key words: Optical density, Bacterial Count, Gram-positive and Gram-negative.

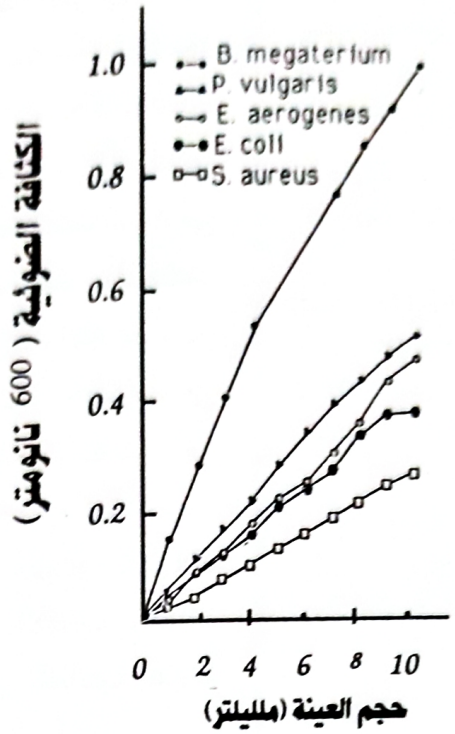
المراجع :

1. *Alexander, M. 1977 Introduction to Soil Microbiology 2nd. edt. John Wiley & Sons (Publisher).*

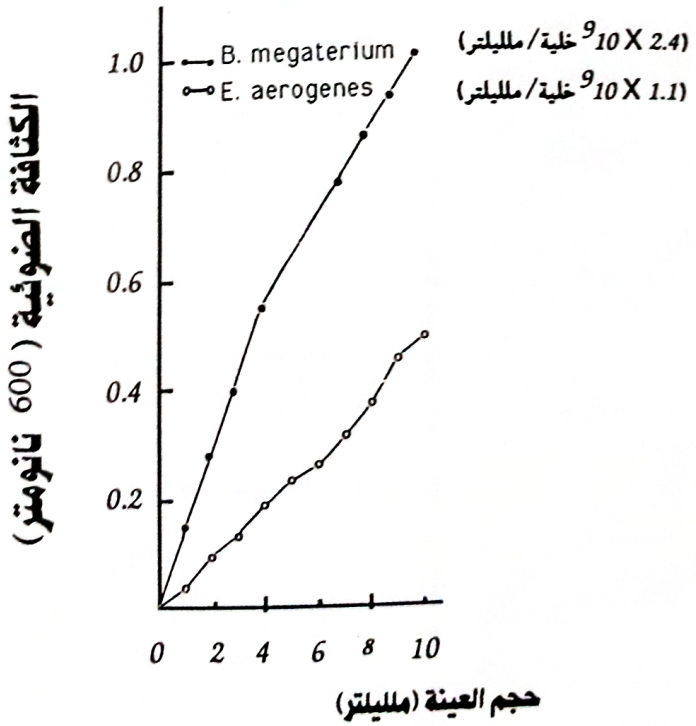
2- *Stanier, R. Y., J. l. Ingraham, M. L. Wheelis and P. R. Painter 1986 The Microbial World . Fifth Edt. Prentice Hall (Publisher).*

3- *Alexander, M. 1973 Most-Probable-Number Method for Microbial Population. pp. 1467-1472 Agronomy Monograph No. 9 Part 2. C. A. Black and others (Editors).*

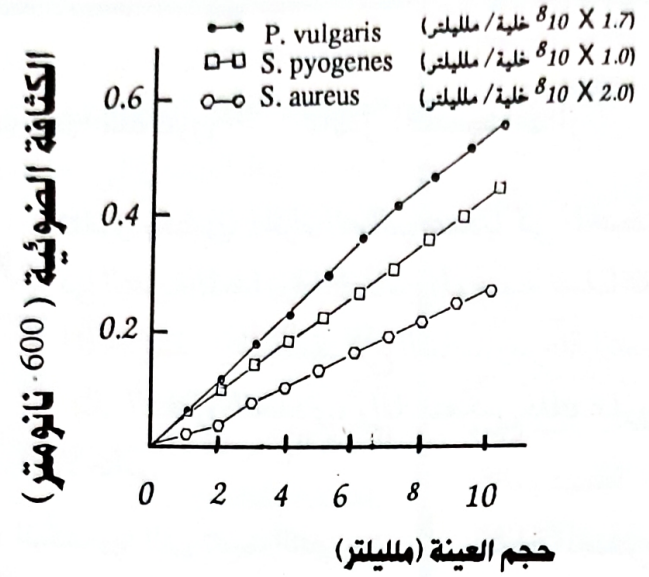
شكل ١ منحنيات قياسية تمثل العلاقة بين الكثافة الضوئية
لأجناس من البكتيريا السالبة والموجبة لتفاعل جرام.



شكل2 مقارنة الكثافة الضوئية لجنسين من البكتيريا العضوية
لهما نفس الكثافة العددية ويختلفان فى تفاعلهما لتصبيغ جرام.



(شكل3) مقارنة الكثافة الضوئية لثلاث أجناس من البكتيريا لها نفس الكثافة العددية وتختلف فى تفاعلها لتصبيغ جرام وفى الشكل العام للخلية.



شكل4 الكثافة الضوئية المقاسة لثلاث عينات من معلق التربة تحت أغطية نباتية مختلفة