عد الخلايا البكتيريه Enumeration of Bacteria Cell

اولا":الطريقه المباشره Direct Method وتشمل

- **العد المجهري المباشـــر Direct Microscope Count:** ناخذ شـــريحه زجاجيه ونثبت عليها لطخه وننشرها بمساحه مناسبه بعد ذلك نصبغها باستخدام Methylene Blue ثم نضعها تحت المجهر ونبدأ بلعد وهذه ابسط طريقه

- **غرف العد Counting Chamber:** توضـع شـرائح زجاجيه خاصـه تكون مقسـمه من الداخل الى مربعات صـغيره عددها 64مربع ومقسـمه على اربعه مربعات كبيره وكل مربع منها يحتوي على 16 مربع صـغير ويبلغ طول ضـلع المربع الصغير 20/1 ملم وارتفاعه 10/1 ملم

طريقه العمل :ناخذ غرف العد وبواســطه ماصـــه دقيقه نأخذ حجم معين من مزرعه ســائله وننقله الى هذه الغرفه عن طريق اخدود موجود على الشــريحه .ننشر هذ الحجم داخل الشريحه ومن ثم نضعه تحت المجهر ونبدأ بالعد .نحسب في كل مربع كبير اعداد البكتريا الموجوده وبعد ذلك نحســب في المربع الكبير الثاني والثالث والرابع

من مســاوئ الطريقه المباشــره انها لاتعطينا عدد حقيقي للاحياء المجهريه لأننا نحسب الخلايا الميته والحيه وفي بعض الاحيان نحسي الشوائب ودقائق الصبغ في حاله التصبيغ

ثانيا":الطريقه الغير مباشره Indirect Method وتشمل عد الاطباق الهوائي تعتبر افضـل من الطريقه المباشـره لحسـاب عدد الخلايا البكتيريه بصـوره دقيقه تقريبا",وهذه الطريقه تتم اما بواسطه النشر او الصب وقبل استخدام هاتين الطريقتين يجب اجراء تخفيف للعينه المراد حساب الاعداد البكتيريه فيها ويتم التخفيف كالتالي:

اذا اردنا مثلا"حســـاب عدد الاحياء المجهريه الموجوده في التربه ناخذ وزن معين من التربه 5 غم ونضـــعه في دورق زجاجي يحتوي على 10 مل من الماء المقطر فنحصـــل على محلول معلق وبعد ذلك نهيئ عددا" من انابيب الاختبار يحتوي كل

منها 9 مل من الماء المقطر او محلول التخفيف (ماء مقطر +ببتون)ننقل بواسطه ماصه معقمه امل من المحلول المعلق الاصلي الى الانبوبه رقم 1 فنحصل على تخفيف يساوي 10 $^{-1}$=10/1نرج هذه الانبوبه جيدا"ثم ننقل منها وبواسطه ماصه معقمه ثانيه امل الى الانبوبه رقم 2 فيصبح التخفيف 10 $^{-2}$ =100/1 وهكذا مع بقيه الانابيب

الى متى نستمر بالتخفيف؟

نستمر بالتخفيف حسب مدى تلوث المادة المفحوصه فاذا كانت شديدة التلوث نفترض مياه المستنقعات او المجاري نجري تخافيف اكثر مما لو كانت العينه المفحوصه من ماء الحنفيه والسبب في ذلك هو ان ماء الحنفيه معامل بعدة معاملات ومن ثم مضاف اليه الكلور ممايؤدي الى اختزال المحتوى الجرثومي الى اقل مايمكن .فتذا استمرينا بتخفيف ماء الحنفيه فلن نحصل على اي نمو للاحياء المجهريه والغرض من التخفيف بصوره عامه هو التقليل من التزاحم والنمو الكثيف للاحياء المجهريه ممايساعد ويسهل عمليه العد

بعد اجراء التخافيف المذكوره انفا"نستطيع وبواسطه ماصه معقمه واحدةان ننقل (1مل)من جميع التخافيف اعلاه بشرط ان ننقل من بعد التخفيف 10^{-5} اما اذا نبداء من التخفيف 10^{-1} فيجب استبدال الماصه عند كل تخفيف وصلا"الى التخفيف النهائي والسبب في ذلك هو ان احتماليه تلوث الماصه من التخفيف الاخير 10^{-5}بحمل جرثومي يتواجد داخل الماصه يكون ضعيفا"جدا"لان التخفيف كبير جدا" اما اذا اخذنا من التخفيف الاول 10^{-1} فمن المحتمل وجود عدد معين من الاحياء المجهريه داخل الماصه لان التخفيف قليل

نحضر اطباق بتري معقمه فارغه بعدد التخافيف وننقل (امل) من كل تخفيف ونضعه في منتصف الطبق ثم نضيف في كل طبق 15-20مل من وسط زرعي صلب في حاله سائله ثم نحرك الاطباق يمينا"ويسارا"او بصوره دائريه على المنضدة وذلك لمزج العينه مع الوسط الغذائي هذه الطريقه تسمى طريقه الصب ثم نترك الاطباق لمدة من الزمن حتى تصلب وبعد ذلك نضعها في الحاضنه بصوره مقلوبه وبدرجه حراره 35-37 مولمدة 48 ساعه

اما طريقه النشر فتتم بتحضير اطباق زجاجيه تحتوي على اوساط صلبه جاهزة ثم ناخذ (امل) من كل تخفيف ونضعه في طبق بتري وبواسطه الناشر المعقم ننشر العينه على الطبق ثم نترك الاطباق لحين حصول الامتصاص وبعد ذلك نضع الاطباق بصورة مقلوبه في الحاضنه بنفس درجه الحراره والمده الزمنيه المذكروة سايقا".بعد انتهاء مدة الحضن نستخرج الاطباق من الحاضنه ونبدأ بحساب المستعمرات الناميه اذا ان كل مستعمره تمثل خليه واحدة

- ❖ طريقه النشر تعتبر افضل من طريقه الصب في حساب الاعداد البكتيريه لان المستعمرات ناميه فوق الوسط الغذائي فقط ممايسهل من عمليه عدها كذلك في طريقه الصب نستخدم وسط صلب في حاله سائله اي بحدود 45-50 م ومن المحتمل ان هذه الدرجه تقتل بعض الاحياء المجهريه ممايعطي بالنتيجه عدد غير حقيقي لتلك الاحياء.
- ❖ اعداد المستعمرات المسموح بها تتراوح (300-30)مستعمره في الطبق الواحد وبعد ذلك نستطيع استخراج اعداد الخلايا

عدد الخلايا البكتيريه = عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف × الكميه الماخوذه

مثلا"اذا كان عدد المستعمرا (50)ناتجه من اخذنا من التخفيف 10^{-3} يصبح عدد الخلايا البكتيريه=50×1000 × امل=5000 خليه /امل
وفي حاله ظهور اكثر من 300 مستعمره في الطبق فهذه العينه لاتعد .اما اذا لم يظهر في جميع التخافيف فاننا ناخذ من اقل تخفيف 10^{-1}