



احياء مجهرية

التعداد الجرثومي

المرحلة الرابعة

م.م ساره عبدالحميد حسن

التعداد الجرثومي Bacterial count

يعد عد الجراثيم من المتطلبات المهمة في دراسة وتنمية الجراثيم مثل:

حالات الخمج التجريبي experimental infection

حالات التسمم الغذائي

تحضير اللقاحات

يمكن حساب اعداد الجراثيم ما يلي:

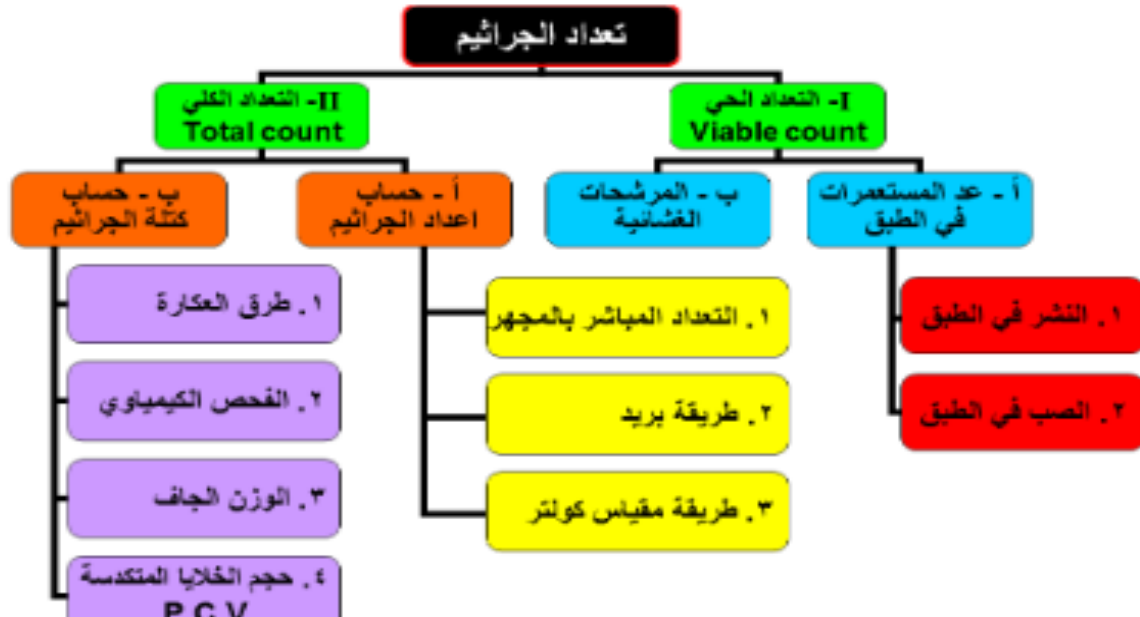
1_ حساب اعداد الجراثيم Bacterial count

وتستعمل هذه الطريقة مع الخلايا الاحادية التي يسهل تعدادها مثل الجراثيم والخمائر

2_ حساب كتلة الخلايا cell mass

وتستعمل هذه الطريقة في الحالات التي تكون فيها الجراثيم متكدسة او متجمعة على بعضها ويصعب جعلها خلايا منفردة وكذلك ان كانت خيطية مثل الفطريات

يقسم التعداد الجرثومي الى قسمين اساسيين هما التعداد الحي والتعداد الكلي



طريقة العد بالأطباق Plate Count Method

طريقة لتحديد أعداد الكائنات المجهرية الحية خاصة وحيدات الخلايا ، اذ تزرع تخافيف المزارع السائلة أو المواد الحاوية على الأحياء المجهرية على سطح الوسط الغذائي الصلب أو تخلط مع الوسط الغذائي قبل تصلبيه وتصب في الأطباق وتترك لتتصلب ثم تحضن الأطباق لمدة وحرارة ملائمة لنمو الأحياء ثم تعد المستعمرات الناتجة من الخلايا الموجودة في النموذج لتمثل عدد الاحياء في النموذج بافتراض ان كل مستعمرة تنتج من خلية واحدة او مجموعة صغيرة من الخلايا وتتم بطريقتين:

أ_النشر في الطبق/

توضع كمية ٠,١ مل من المحلول المخفف الذي يحتوي على الجراثيم تنتشر بوساطة الناشر الزجاجي المعقم بالكحول والتلبيب (لاستخدم المسحات القطنية لانها تمتص جزء من العالق البكتيري) يتم نشر العالق الجرثومي على كل الطبق يترك الوسط لمدة ٥ دقائق لكي يتم امتصاص العالق توضع الاطباق في الحاضنة بدرجة ٣٧ م لمدة ١٦_٢٤ ساعة بعد ذلك يتم عد المستعمرات النامية في الطبق ويحسب عدد الجراثيم حسب الطريقة التالية العدد الجرثومي للعينة الاصلية = العدد الكلي للمستعمرات في الطبق × ١٠ × مقلوب التخفيف

ب_ طريقة الصب في الطبق/

يتم تخفيف العينة المراد معرفة التعداد الجرثومي لها توضع النقلة الجرثومية (٠,١) مل من العالق الجرثومي في طبق بتري يضاف له الوسط الزرعي المحضر ويتم تحريك الطبق باتجاه عقارب الساعة وبعكسها ايضا حتى يتجانس يترك الاكار ليتصلب ثم توضع الاطباق في الحاضنة بدرجة حراره ٣٧ م ولمده تتراوح بين ١٦_٢٤ ساعة بعد ذلك يتم عد المستعمرات النامية في الطبق ويحسب عدد الجراثيم حسب الطريقة التالية العدد الجرثومي للعينة الاصلية = العدد الكلي للمستعمرات في الطبق × ١٠ × مقلوب التخفيف

طريقة المرشحات الغشائية:

يمكن قياس اعداد الجراثيم الحية بتمرير العينة من خلال المرشحات الغشائية التي تحجب او تعيق مرور الجراثيم
 فتنقى الخلايا الجرثومية فوق السطح الغشائي ثم بعد ذلك يؤخذ السطح الغشائي ويوضع فوق سطح الاكار المناسب للنمو
 حيث يمتص غشاء المرشحة المواد الغذائية من الوسط وهذا يؤدي الى نمو الجراثيم الى مستعمرات مرئية فوق سطح الغشاء

من طرق العد المباشر:

طريقة العد باستخدام المجهر

Breed method وهي طريقة سريعة تجرى بأخذ حجم معين من المزرعة ووضعه على شريحة مجهرية خاصة ثم تصبغ هذه المسحة وتفحص تحت المجهر الذي يكون مساحة الحقل المجهرى فيه معلومة فتحسب عدد الخلايا في الحقل فيعرف عدد البكتيريا في الملمتر الواحد في المزرعة السائلة (تستخدم هذه الطريقة لحساب الاحياء في الماء والحليب)

كما يمكن استخدام غرفة عد كريات الدم الحمراء وهذه تحتوي على ٢٥ مربع مساحة كل مربع ٤٠٠/١ ملم ٢ تغطي الشريحة

بغطائها فتترك مساحة قدرها ٥٠/١ ملم ولذا يكون حجم السائل فيها معلوم وهو ٢٠٠٠٠/١ ملم ٣ فوق كل مربع وبذا يكون حجم المربع الواحد معلوم وعند حساب عدد الخلايا في المربع الواحد فتكون مثلا ١٠٠ يعني ان العدد ١٠٠ بكتيريا مضروبة ب ٣ ملم وبذا نحصل على العدد البكتيري في ملم ٣ واحد. ممكن تخفيف 20000 البكتيريا إذا كان عددها كبير

سليبات هذه الطريقة هي:

لا يمكن التمييز بين الخلايا الميتة والحية. صعوبة توزيع العينة على الشريحة بشكل منتظم .

من طرق حساب كتلة الجراثيم:

تقدير درجة تعكير البيئة Turbidimetric method

تنمو الميكروبات في الاوساط السائلة ويزداد هذا النمو بزيادة تعكر الوسط بسبب ازدياد عدد الخلايا فيه فأذا مررنا حزمة ضوئية خلال الوسط فأ، الخلايا البكتيرية تمتص وتبعثر بعض هذه الاشعة الضوئية والحقيقة ان كمية الضوء الممتصه والمبعثره تتناسب مع كتلة الخلايا في الوسط حيث ان عدد الخلايا يؤدي الى زيادة تبعثر الضوء وامتصاصه ولقياس مدى هذا التبعثر يستعمل اما مقياس الطيف الضوئي او مقياس التعكر

وتستعمل هذه الطريقة بكثرة في دراسة نمو البكتريا لسرعتها ودقتها

ومن سلبيات هذه الطريقة انه لايمكن استعمالها في الاوساط الملونه او التي تحتوي على مواد عالقه اخرى غير الخلايا البكتيرية او عندما يكون نمو المزرعة ضعيفا كما ان هذه الطريقة تحسب الخلايا الحيه والميته على حد سواء

جامعة تكريت