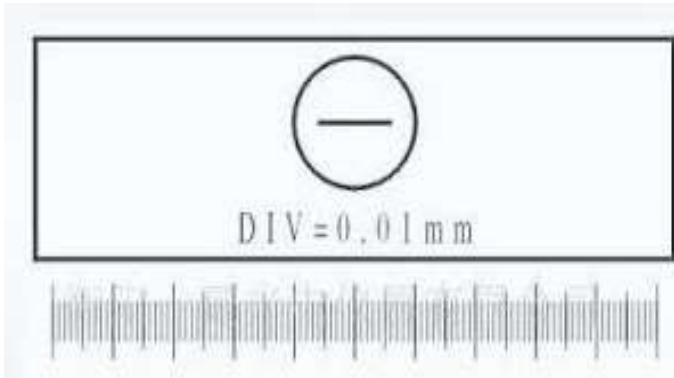
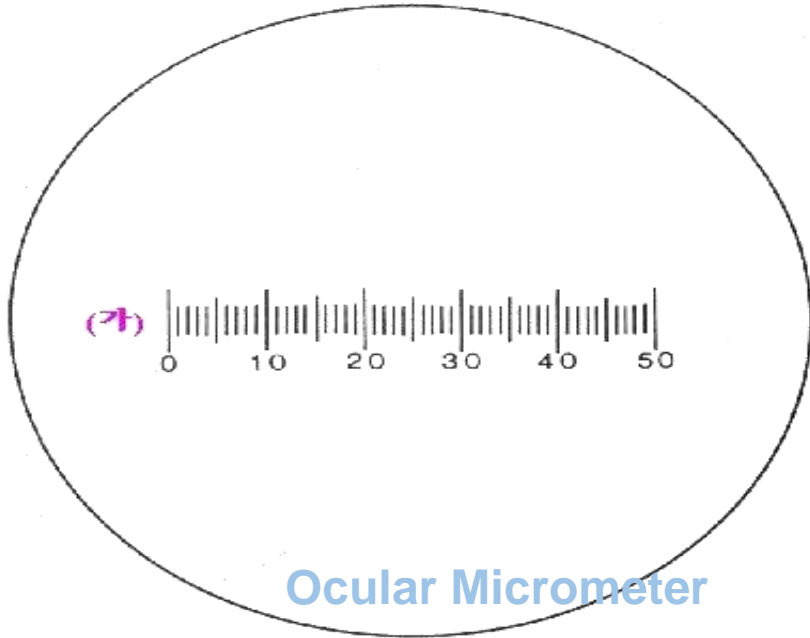


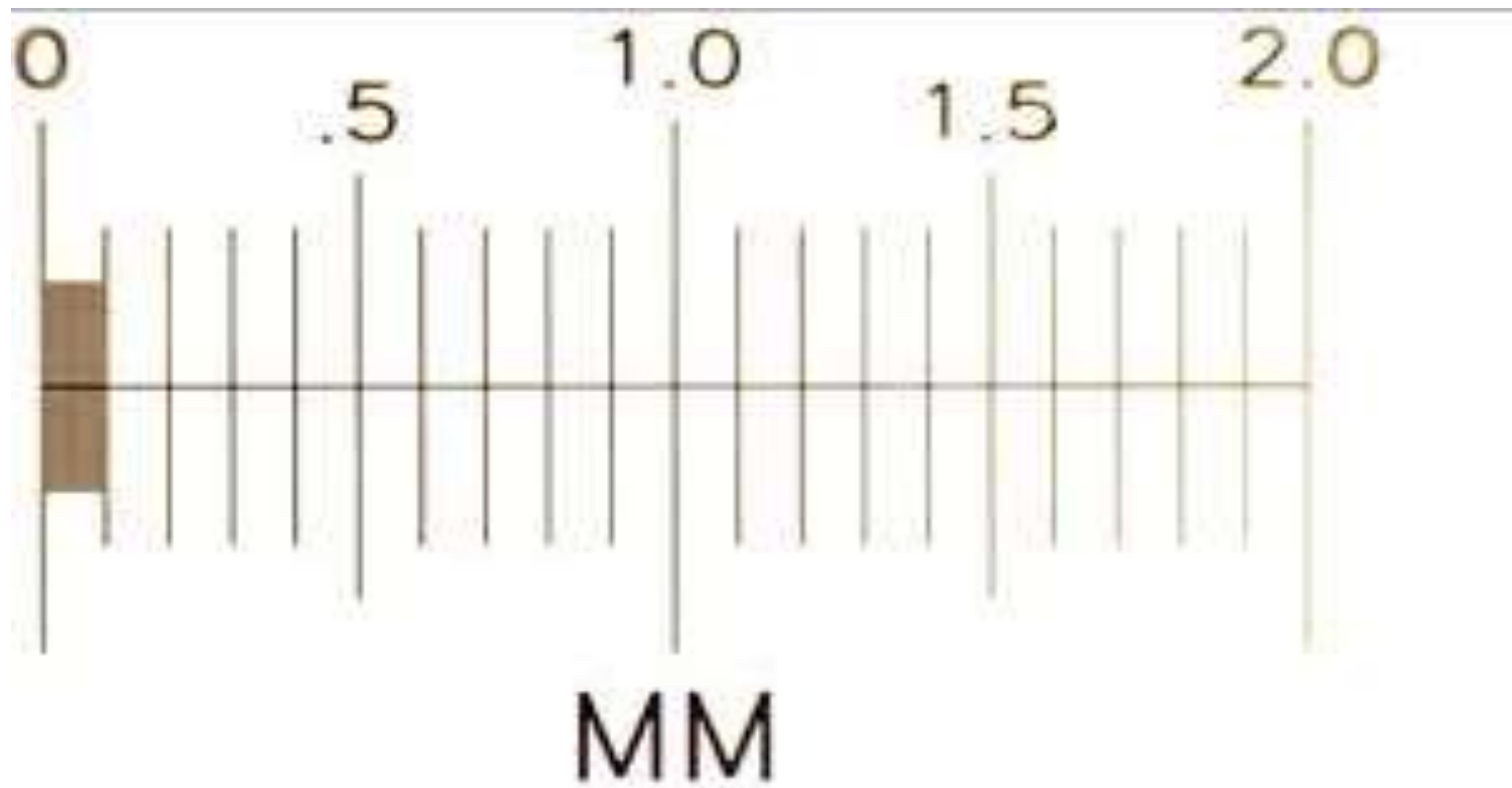
قياس حجم الخلايا البكتيرية

التقدير المباشر لعدد الخلايا البكتيرية

قياس حجم البكتيريا



- لتقدير حجم الخلية أو الجرثومة يقاس طول وعرض الخلية, ويستعان في ذلك بمقياس عيني يعرف بـ **Ocular micrometer** يوضع في العدسة العينية من المجهر .
- تعابير اقسام المقياس (إيجاد قيمة كل قسم) بالاستعانة بمقياس دقيق معروف ومثبت على شريحة خاصة يعرف بـ **Stage micrometer** (عبارة عن تدريج طوله 1 ملم مقسم لـ 100 جزء , كل جزء يساوي 10 ميكرون) يوضع على مسرح المجهر .
- (تختلف المعايرة لأجزاء المقياس العيني باختلاف قوة التكبير) العدسة الشيئية (حيث أن القيمة في حالة استخدام القوة 10 تختلف عن القيمة في حالة استخدام القوة 100 وهكذا)



1 ملم = 1000 ميكرومتر

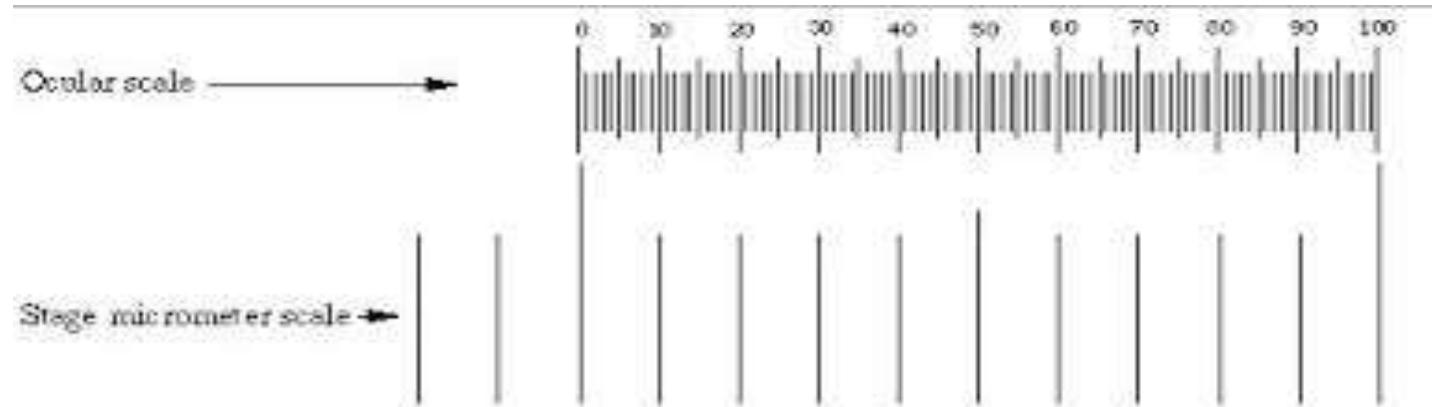
خطوات العمل:

أولاً: معايرة العدسة الميكرومترية :

- تنزع العدسة العينية المركبة من المجهر , يفصل الجزء العلوي منها , ثم يوضع الميكرومتر العيني بأنبوبتها (تأكيد من ارتكازه على المكان المخصص له) , ثم يعاد تركيب الجزء العلوي من العدسة في مكانه.
- توضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب تثبت ثم تضبط حتى يمكن مشاهدة تقسيماتها بالعدسة الصغرى (لاحظ أن تدرج الشريحة يوجد بداخل دائرة سوداء) يستعمل الضابط الدقيق حتى ترى التقسيمات بوضوح .
- توضع قطرة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية, ثم تحرك القطعة الأنفية لتكون العدسة الزيتية في وضع الاستعمال . يحرك الضابط الدقيق حتى تشاهد أقسام تدرج الشريحة الميكرومترية بوضوح .

- حدد منطقة من التدرج العيني (الميكروميتر العيني Ocular micrometer) تكون مساوية في الطول ومقابلة لمنطقة من تدرج الشريحة الميكرومترية (يفضل أن يكون الخطان المتطابقان من كل التدرجين ابعد ما يمكن عن بعضهما) قدر عدد أقسام الميكروميتر العيني التي تقابل عدد من أقسام الشريحة الميكرومترية في المناطق المتطابقة. وحيث أن القسم الواحد من أقسام تدرج الشريحة الميكرومترية يساوي 10 ميكرون , فبذلك يمكن تقدير طول القسم الواحد من أقسام الميكروميتر العيني باستعمال الشيئية المغمورة في الزيت (العدسة الزيتية 100) .

ايجاد قيمة كل جزء من اجزاء
الميكروميتر العيني



$$\text{قيمة كل جزء من اجزاء الميكروميتر العيني} = \frac{\text{عدد اجزاء الشريحة الميكرومترية} \times 10}{\text{عدد أجزاء العدسة الميكرومترية}}$$

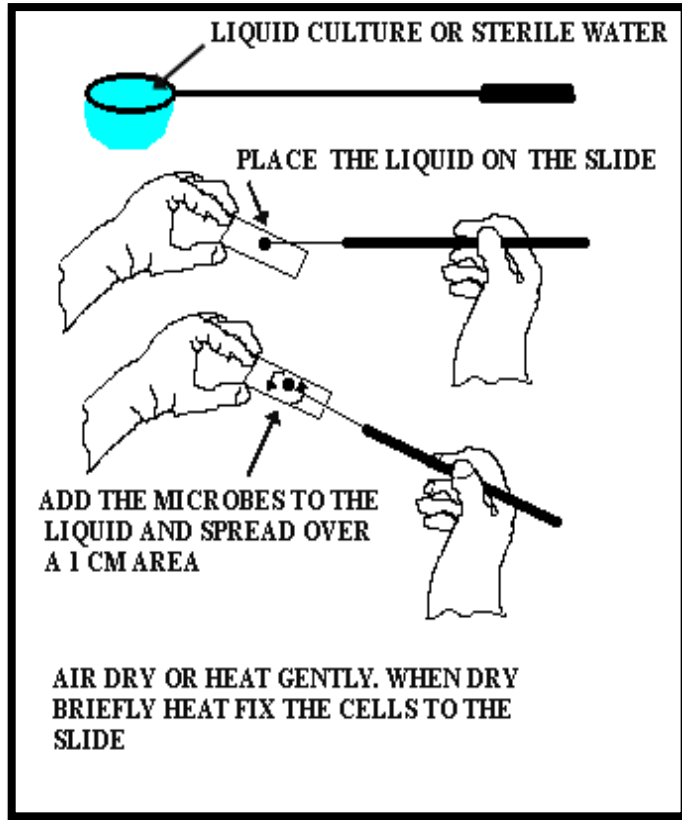
- فمثلا إذا وجد أن 90 قسم من الميكروميتر العيني تنطبق على 15 قسم من أقسام الشريحة الميكروميتريّة فإن طول القسم الواحد من الميكروميتر العيني = عدد أجزاء الشريحة الميكروميتريّة $\times 10$ / (مقسوم) عدد أجزاء الميكروميتر العيني .

$$\frac{10 \times 15}{90}$$

$$= 1.67 \text{ ميكرون}$$

- ترفع الشريحة الميكروميتريّة وتنظف جيدا من زيت السيدر وتحتفظ في مكان أمين

ثانيا : إعداد الغشاء البكتيري وصبغة :



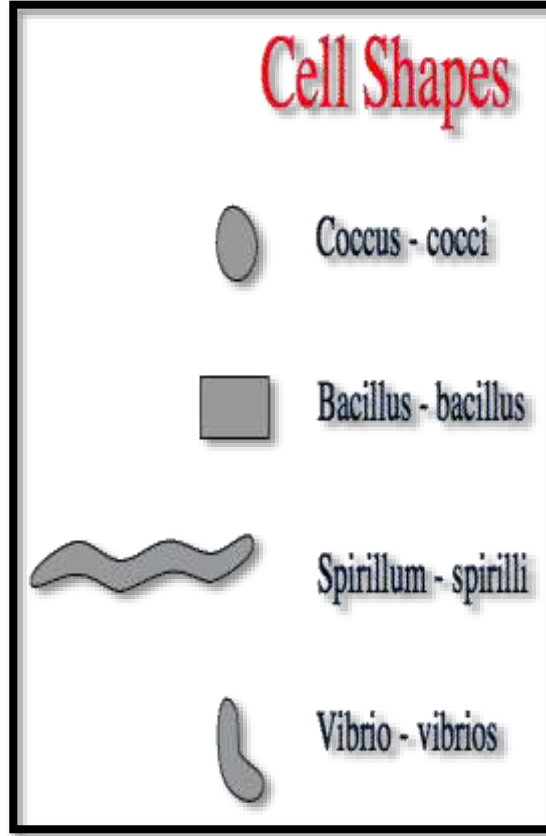
- يتم إعداد الغشاء البكتيري بالطرق التي تم شرحها في الصبغ البسيط , كما يتم تثبيت الغشاء البكتيري بتمرير الشريحة في اللهب من 2 - 3 مرات .
- يصبغ الغشاء البكتيري وذلك بغمرة بكمية مناسبة من صبغة أزرق الميثيلين المخففة لمدة دقيقتين .
- نتخلص من الصبغة الزائدة في الحوض ثم تغسل الشريحة تحت تيار ماء خفيف , ثم تجفف بين ورقتي ترشيح .

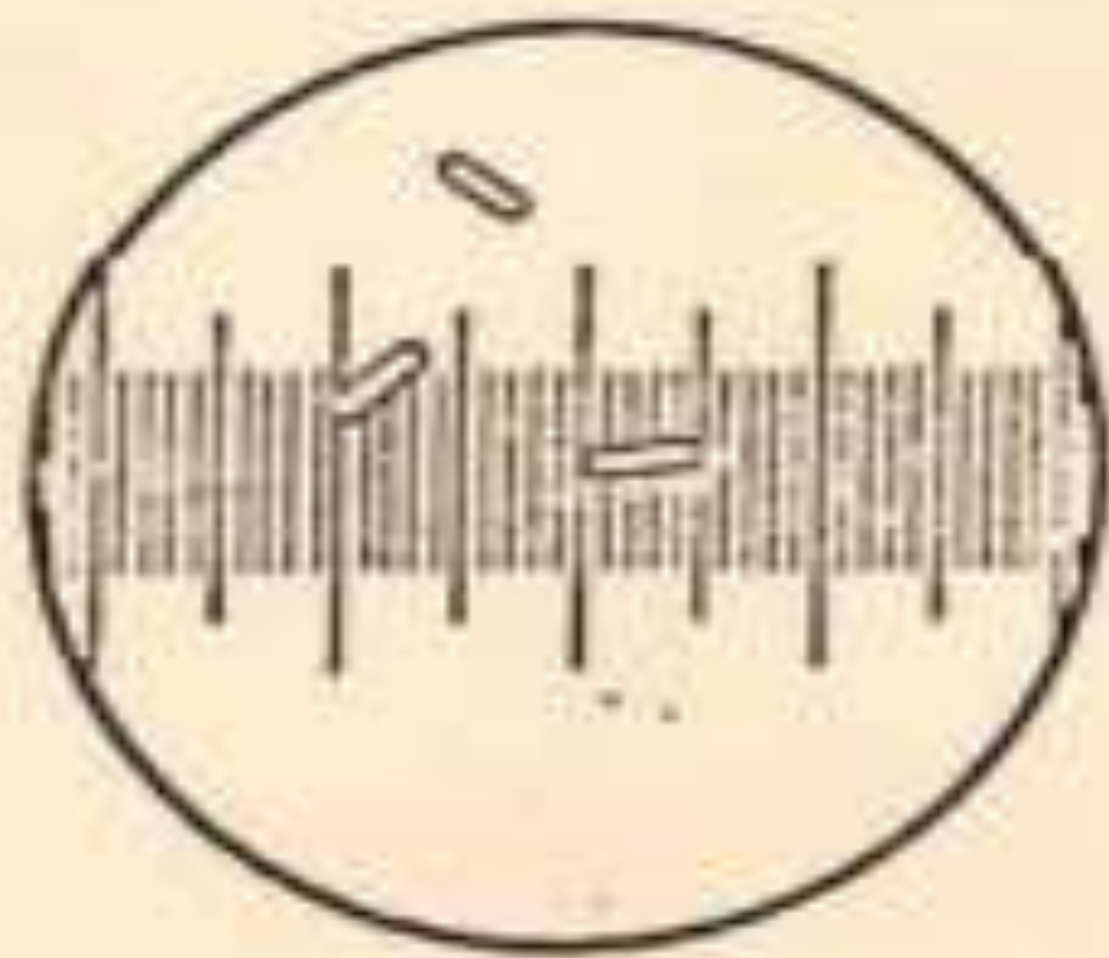
ثالثا : فحص الغشاء البكتيري وقياس طول وعرض الخلايا :

- توضع الشريحة المحتوية علي الغشاء البكتيري المصبوغ علي منصة المجهر ثم تفحص باستخدام العدسة الزيتية .

- نفحص الغشاء باستخدام العدسة العينية المحتوية علي الميكروميتر العيني , يتم اختيار إحدى الخلايا البكتيرية ثم يحدد طولها بتقدير عدد أجزاء الميكروميتر العيني المساوية له , كذلك يحدد العرض وذلك بتحديد عدد أجزاء الميكروميتر العيني المساوية له .

- تكرر هذا العملية مع عدد من الخلايا (لا يقل عن 50 خلية) , ثم يتم إيجاد متوسط طول الخلايا ومتوسط عرض الخلايا .





يتم إيجاد متوسط الطول بالميكرون وذلك كما يلي :

إذا فرضنا أن متوسط الطول لـ 50 خلية بكتيرية يساوي 4 أجزاء من أجزاء الميكروميتر العيني فإن طول الخلية بالميكرون = (عدد أجزاء الميكروميتر العيني المساوي لطول الخلية \times قيمة كل جزء من أجزاء الميكروميتر العيني) $4 \times 1.67 = 6.68$ ميكرون.

إذا فرضنا أن متوسط العرض لـ 50 خلية بكتيرية يساوي 2 جزء من أجزاء الميكروميتر العيني, فإن عرض الخلية بالميكرون = (عدد أجزاء الميكروميتر العيني المساوي لعرض الخلية \times قيمة كل جزء من أجزاء الميكروميتر العيني) $2 \times 1.67 = 3.34$ ميكرون .

بما أن حجم الخلية البكتيرية = الطول \times العرض

إذا حجم الخلية البكتيرية = 6.68 ميكرون $\times 3.34$ ميكرون .

(نلاحظ هنا أننا لا نوجد ناتج الضرب حيث أن هذه النتيجة تعني أن البكتيريا عصوية في شكلها لها

طول يساوي 6.68 ميكرون ولها عرض يساوي 3.34 ميكرون) .

التقدير الكمي للنمو البكتيري

تقدير عدد الخلايا البكتيرية في عينة ما

أولاً: التقدير المباشر لعدد الخلايا **Cell Count** (استعمال شرائح (خاصة – عادية)) فيها يتم تقدير العدد الكلي للخلايا (سواء الحية أو الميتة)

ثانياً: التقدير الغير مباشر لعدد الخلايا فيها يتم تقدير عدد الخلايا الحية فقط (طريقة العد بالأطباق) **Plate count**

التقدير المباشر لعدد الخلايا البكتيرية في التربة بالطريقة الميكروسكوبية المباشرة أو بطريقة الشريحة العادية

مزايا هذه الطريقة:

- تساعد على الدراسة الوصفية (النوع والشكل) للأحياء الدقيقة (البكتيريا) في العينة .
- تعطي نتائج سريعة .

عيوبها:

- في هذه الطريقة تعد الميكروبات (البكتيريا) الحية والميتة .
- مجهده للنظر

الأدوات والمواد اللازمة:

- شرائح زجاجية عادية .
- ورق رسم بياني .
- شريحة ميكرومترية Stage micrometer .
- ماصات معقمة سعة 0.01 مليلتر .
- صبغة ازرق المثلين.
- العينة المراد تقدير عدد الأحياء الدقيقة فيها (البكتيريا) .

هذا العمل يتطلب إجراء عدد من الخطوات هي:

1. حساب قطر ومساحة المجال المجهرى .
2. حساب عدد المجالات المجهرية في 1 سم² .
3. إعداد غشاء بكتيري وصبغة (من العينة المراد تقدير عدد الأحياء فيها) .
4. حساب متوسط عدد الخلايا البكتيرية في 7 حقل مجهرى .
5. حساب عدد الخلايا البكتيرية في (1 مليلتر) من العينة .

طريقة العمل:

1- حساب قطر و مساحة المجال الميكروسكوبي

يتم ذلك باستخدام كل من الشريحة الميكرومترية و العدسة العينية ($10\times$) ($15\times$) والعدسة الزيتية. وذلك بمعلومية أن الشريحة الميكرومترية تحتوي على تدرج مقسم إلى 100 جزء كل جزء يساوي 10 ميكرون .

أ / يحسب قطر المجال المجهرى:

- حيث تثبت الشريحة الميكرومترية على منصة المجهر , ثم تفحص باستخدام الشيئية ذات القوة (10) وذلك لتحديد موقع التدرج الخاص بالشريحة، بعد ذلك توضع قطرة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية وتستخدم العدسة الزيتية ثم يستخدم الضابط الدقيق حتى يمكن مشاهدة التقسيمات أو التدرج بوضوح .
- حددي طول قطر المجال المجهرى وذلك بضبط بداية تدرج الشريحة الميكرومترية مع بداية ضوء دائرة المجال المجهرى ثم احسبي عدد أقسام الشريحة الميكرومترية المقابلة لدائرة المجال المجهرى ، وبذلك تكوني قد حسبت قطر المجال المجهرى .

• وبفرض أن قطر المجال المجهرى كان (17) جزء من أجزاء الشريحة الميكرومترية وكل جزء من هذه الأجزاء يساوي 10 ميكرون

قطر المجال المجهرى = $17 \times 10 = 170$ ميكرون .

ب / مساحة المجال المجهرى :

• تتم هذه الخطوة باستخدام القانون

• مساحة المجال المجهرى = πr^2

• حيث أن r = نصف القطر $\pi = 3.14$

$$r = \frac{170}{2} = 85 \text{ ميكرون}$$

$$\text{المساحة} = \pi r^2 = 3.14 \times (85 \times 85) = 22758.75 \text{ ميكرون}$$

2 - حساب عدد المجالات المجهرية في 1 سم²

أ/ يتم تحويل 1 سم² إلى ميكرون

كل 1 سم فيه 10 مم

وكل 1 مم فيه 1000 ميكرون

$$10 \text{ مم} \times 1000 \text{ ميكرون} = 10.000 \text{ ميكرون}$$

وبما انه 1 سم² إذا قيمته بالميكرون تساوي

$$10.000 \times 10.000 = 100.000.000 \text{ ميكرون (طول الضلع مضروب في طول الضلع) .}$$

ب / عدد المجالات المجهرية في 1 سم²

$$100000000 / \text{مساحة المجال المجهرى} . (\text{مقسوم على مساحة المجال المجهرى}) .$$

$$100000000 / 22758.75 = 4393.91443 \text{ مجال مجهرى} / 1 \text{ سم}^2 .$$

3 - إعداد غشاء بكتيري من العينه:

- يرسم على الشريحة الزجاجية 1 سم² بواسطة قلم فولومستر مستعينة بورق الرسم البياني أو المسطرة .
- بواسطة ماصة دقيقة يؤخذ مقدار 0.01 مليلتر (التخفيف) من العينه ثم ينشر جيدا على المربع بواسطة ابرة التلقيح المعقمه.
- تترك الشريحة تجف في جو المعمل .
- بعد تحضير الغشاء وتثبيتته يتم صبغه بصبغة ازرق المثلين لمدة دقيقة واحده (صبغ بسيط) .
- تغسل بعد ذلك بالماء ثم تجفف بورق ترشيح

- تفحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة الزيتية ويقدر عدد الميكروبات أو البكتيريا الموجودة في عشرة إلى عشرين مجالا مجهريا مختارة عشوئيا في كل الـ 1سم² المرسوم.
- أكمل بقية العمليات الحسابية لإيجاد عدد البكتيريا في 1 ميللتر من العينة .

4- حساب متوسط عدد الخلايا البكتيرية في 7 مجالات مجهرية :

مثال لذلك الجدول الآتي:

متوسط عدد الخلايا البكتيرية في سبعة مجالات مجهرية =

$$\frac{\text{مجموع عدد الخلايا البكتيرية في كل المجالات}}{\text{عدد المجالات المجهرية}}$$

$$\frac{26+24+5+13+22+10+7}{7}$$

$$= 15 \text{ خلية / مجال}$$

رقم المجال	عدد الخلايا البكتيرية
1	7
2	10
3	22
4	13
5	5
6	24
7	26

5- حساب عدد الخلايا البكتيرية في (1 مليلتر من العينة) :

(حسب المثال المستخدم في الشرح) فإن عدد الخلايا البكتيرية في 0.01 من العينة =

متوسط عدد الخلايا البكتيرية × عدد المجالات المجهرية في 1 سم²
عدد الخلايا البكتيرية في 1 مليلتر من العينة =

$$= 15 \times 4393.91443 \times 100 \text{ (للحصول على عدد الخلايا في 1 مليلتر من المزرعة)} = 6590871.64 \text{ خلية بكتيرية / 1 مليلتر}$$

ملاحظة :

يتم إعداد غشاء بكتيري وصبغة صبغ بسيط إذا كانت العينة المدروسة عبارة عن مزرعة بكتيرية فقط واضعين في الاعتبار طبيعة العينة المراد تقدير عدد الخلايا البكتيرية فيها .

- * اوجدى حجم الخلايا البكتيريه كرويه او عصويه (3 خلايا)
- * اوجدى عدد الخلايا البكتيريه فى 1 مللتر من العينه مع العلم ان المقدار المستخدم لتحضير الغشاء 0.01 مللتر (5 حقول)

