التقدير الغير مباشر لعدد الخلايا البكتيرية

الصبغ المقاوم للاحماض

التقدير الغير مباشر لعدد الخلايا البكتيرية

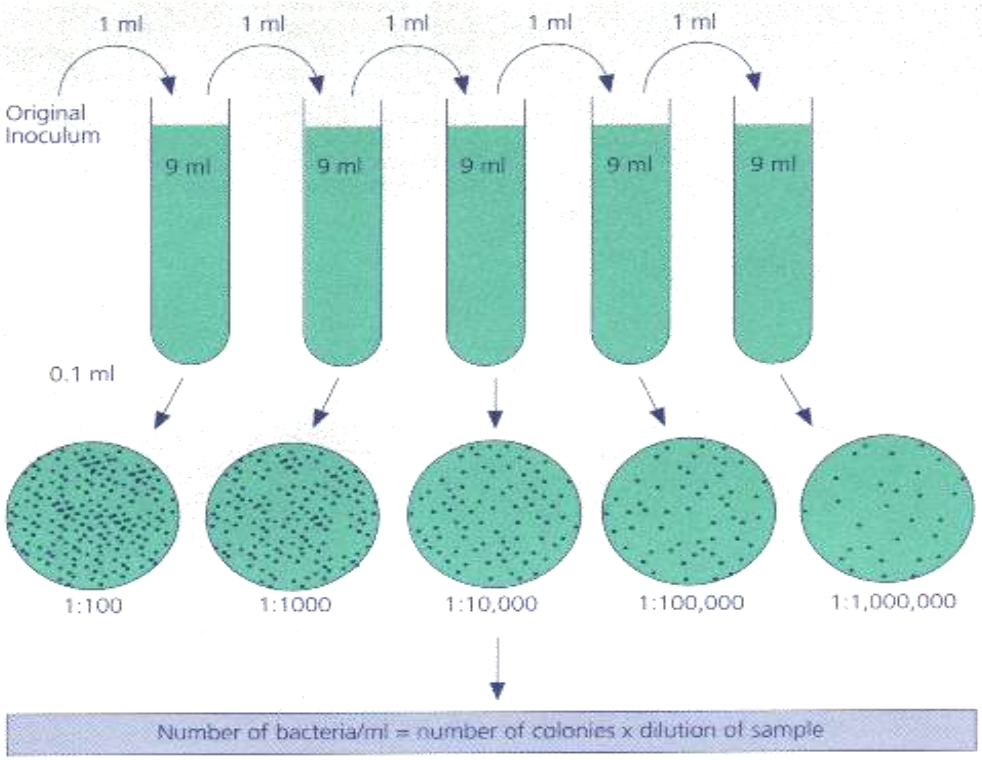
In Direct Cell Count

- بهذه الطريقة يمكن تقدير عدد الخلايا الحية القادرة على النمو والتكاثر تحت الظروف المناسبة لنموها
- يجرى ذلك بطريقة العد بالأطباق **Plate Count method**

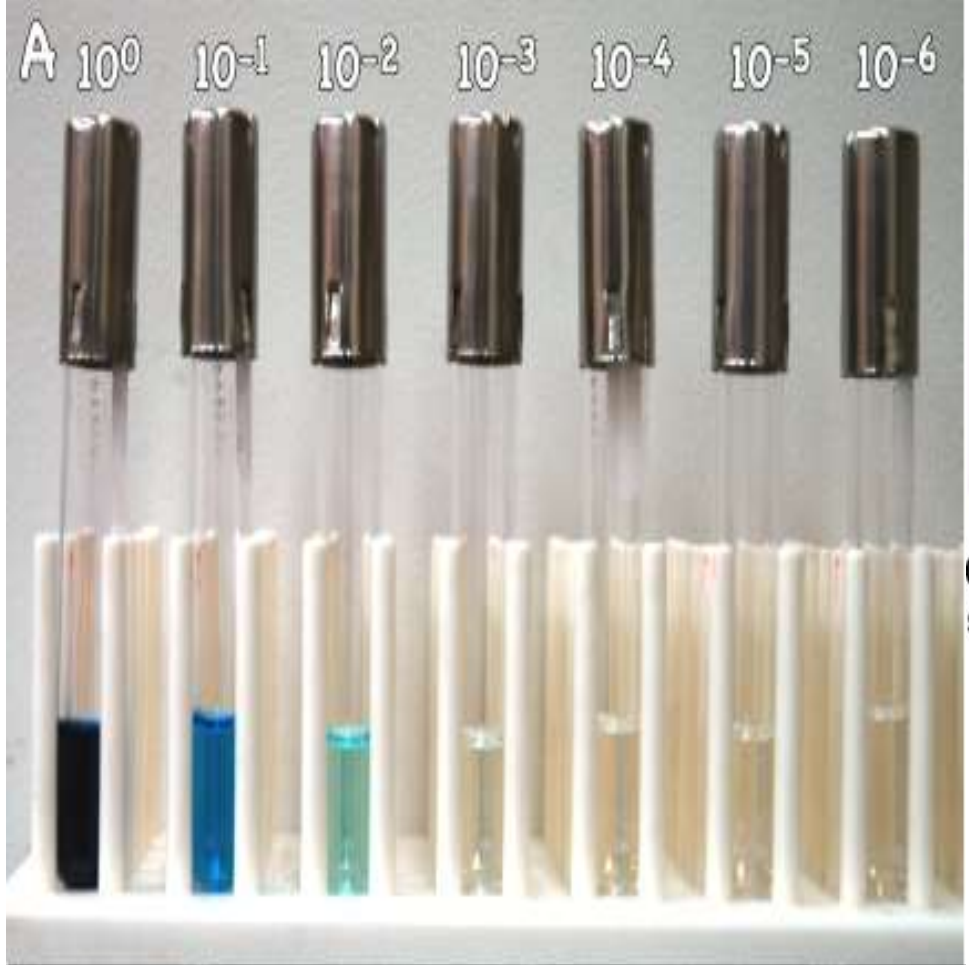
طريقة العمل:

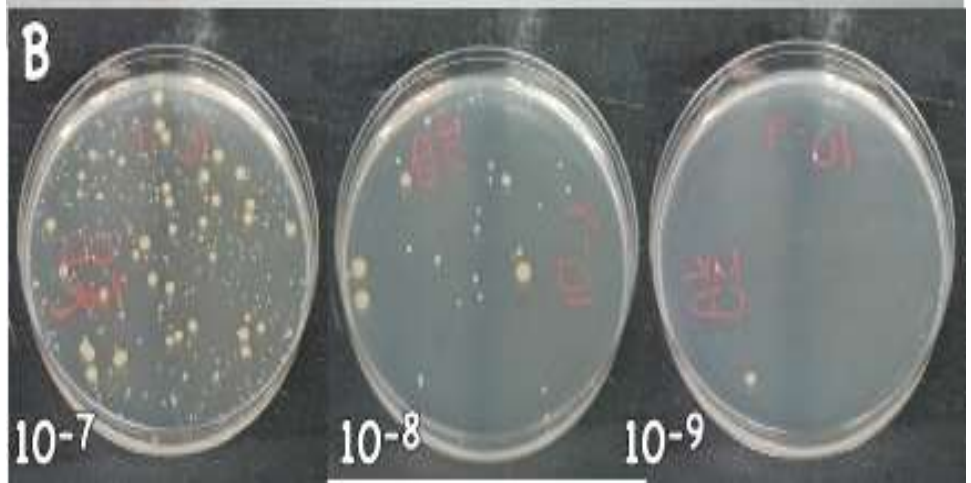
- لديك مزرعة بكتيرية نامية على مرق مغذي, ترج المزرعة جيدا
- بواسطة ماصة معقمة، ينقل 1 مل من المزرعة الى انبوبة تحتوي على 9مل ماء معقم وترج الأنبوبة (تخفيف 1:10)
- ينقل من الأنبوبة السابقة 1مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى انبوبة بها 9مل ماء معقم وترج الأنبوبة (تخفيف 1:100)
- تكرر الخطوة السابقة عدة مرات للحصول على تخفيفات تصل الى 1: 1000000
- ينقل 1مل من التخفيفات الثلاثة الأخيرة الى طبق بتري معقم (طبقين لكل تخفيف)

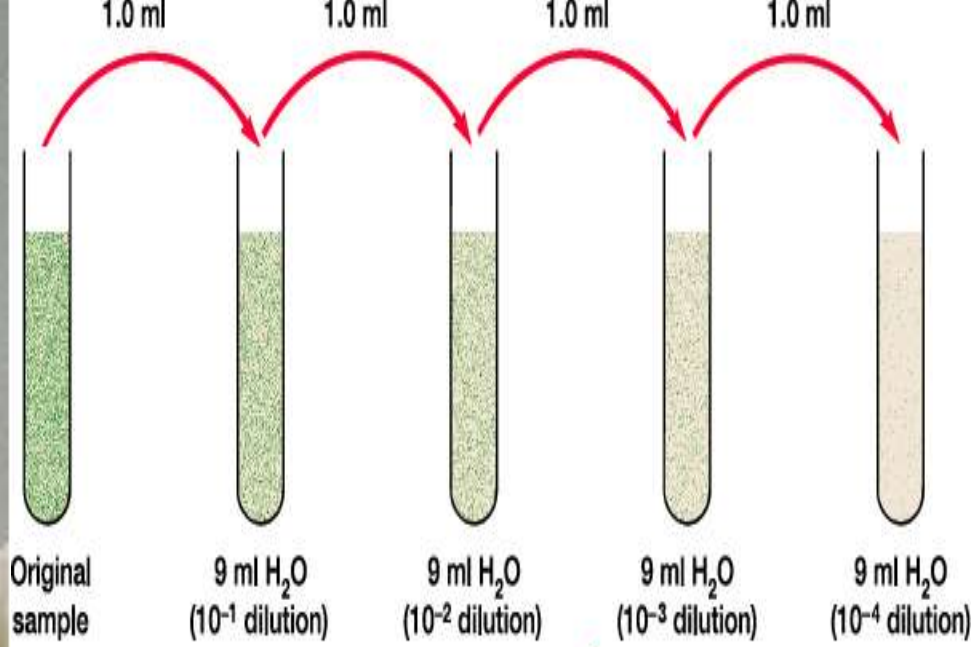
التقدير الغير مباشر لعدد الخلايا البكتيرية

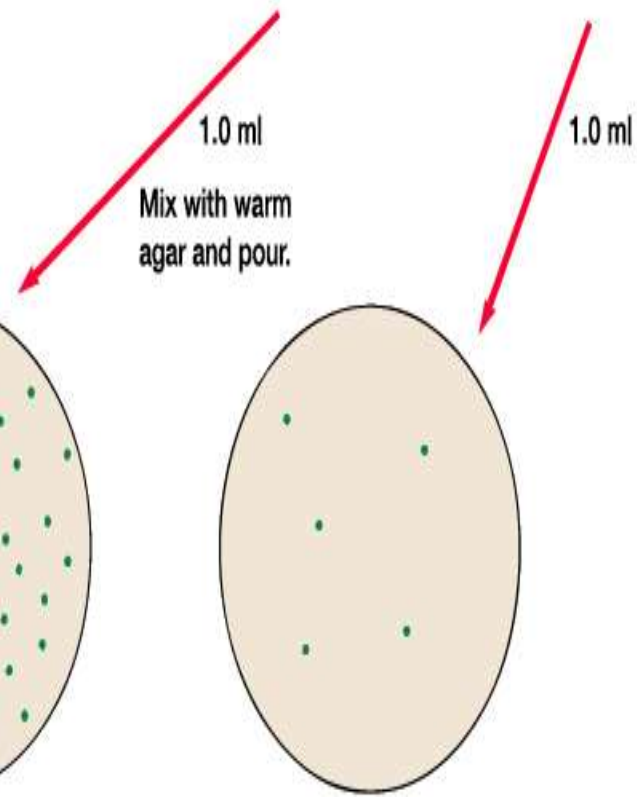


- لكل طبق يضاف كمية مناسبة من وسط الاجار المغذي المسالة والمبردة الى 45م ويحرك الطبق
- تترك الاطباق حتى يتصلب الوسط ثم توضع مقلوبة في الحضان عند 37م لمدة 24ساعة
- يتم اختيار التخفيف المناسب الذي يظهر به عدد المستعمرات يتراوح بين 30–300 مستعمرة بالطبق الواحد
- يحسب عدد الخلايا الحية في 1مل من المزرعة الاصلية بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل


A
10^0
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}


B
10^{-7}
10^{-8}
10^{-9}


1.0 ml
1.0 ml
1.0 ml
1.0 ml
Original sample
9 ml H_2O (10^{-1} dilution)
9 ml H_2O (10^{-2} dilution)
9 ml H_2O (10^{-3} dilution)
9 ml H_2O (10^{-4} dilution)


1.0 ml
Mix with warm agar and pour.
1.0 ml

orig.
10^{-1}
10^{-2}
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
10^{-6}
10^{-7}

الصبغ المقاوم للأحماض

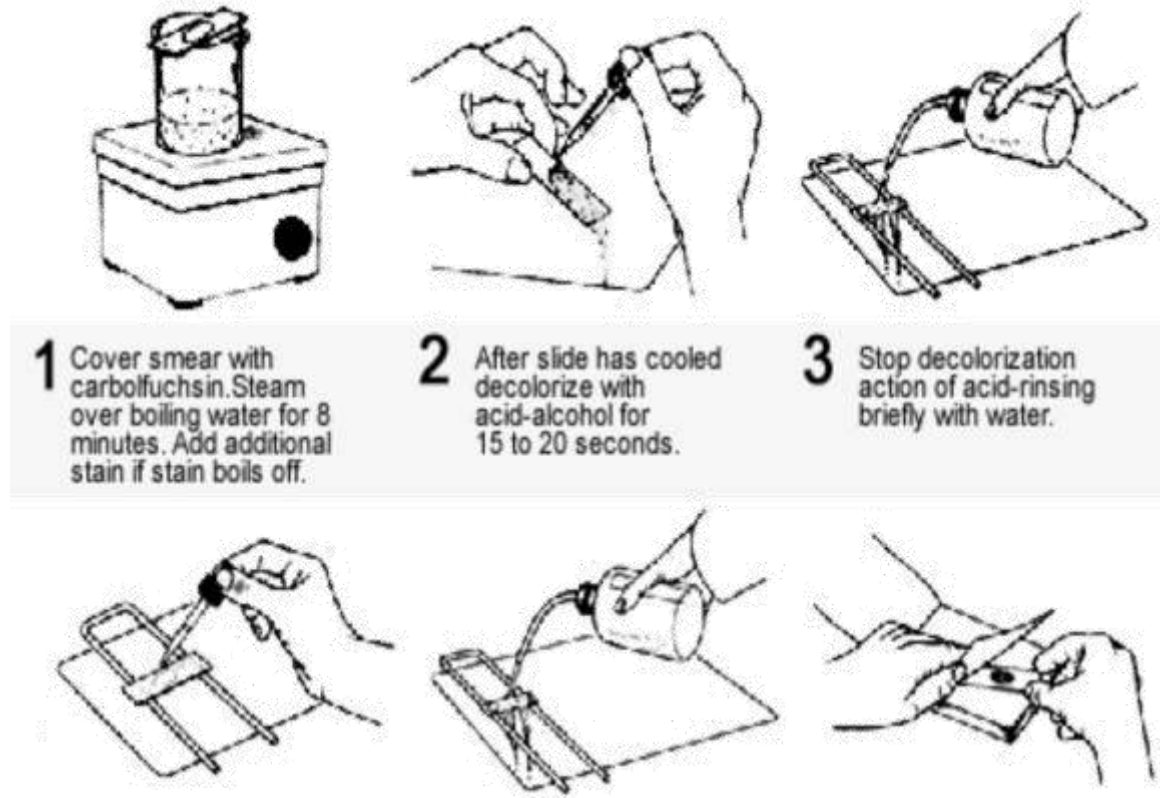
Acid Fast stain

(Ziehl & Neelsen)

- بكتيريا ***Mycobacterium tuberculosis*** التي تسبب مرض السل ذات خواص طبيعية او كيميائية يصعب صبغها بالطرق العادية
- اذا تعرض الغشاء للحرارة خلال الصبغ لمدة طويلة نسبيا فانة يصعب ازالة الصبغة حتى لو غسلت بالكحول المحمض بـ **Hcl** وبالتالي تحتفظ بصبغة كربول الفوكسين وتظهر الخلايا حمراء اللون لذلك تُعرف بانها مقاومة للاحماض **Acid fast**
- – البكتيريا الغير مقاومة للاحماض **Non-acid fast** تزال منها الصبغة خلال الغسيل بالكحول الحامضي وتتلون بالصبغة العكسية (مثل ازرق الميثيلين)
- الطريقة المستخدمة للصبغ **Ziehl & Neelsen**

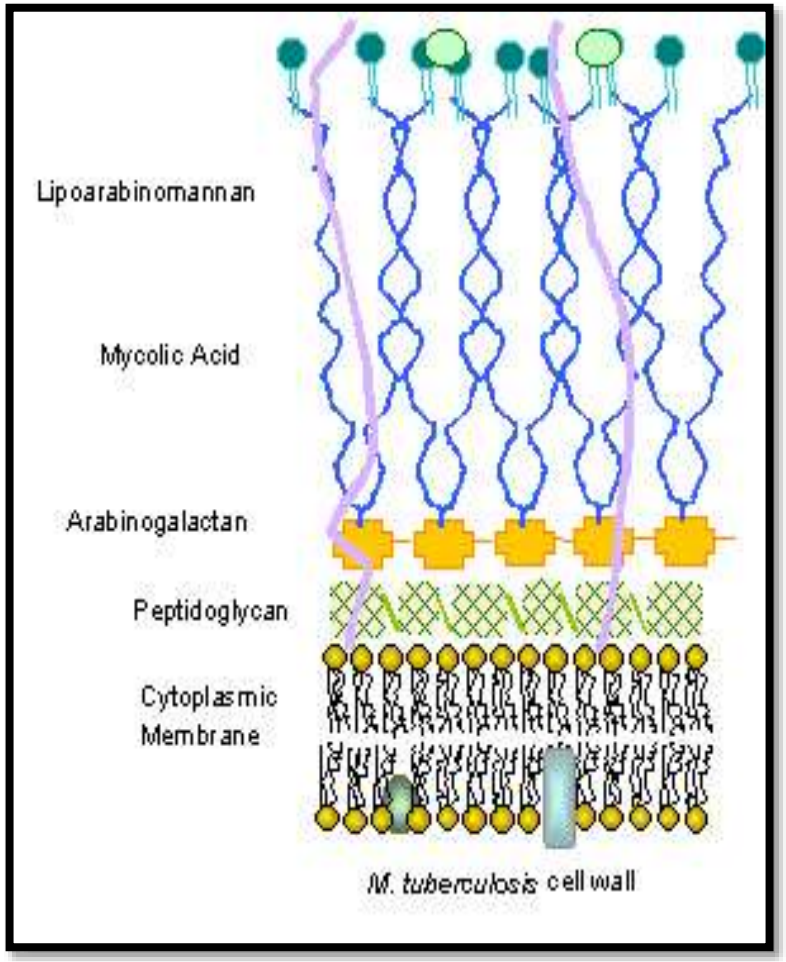
طريقة العمل

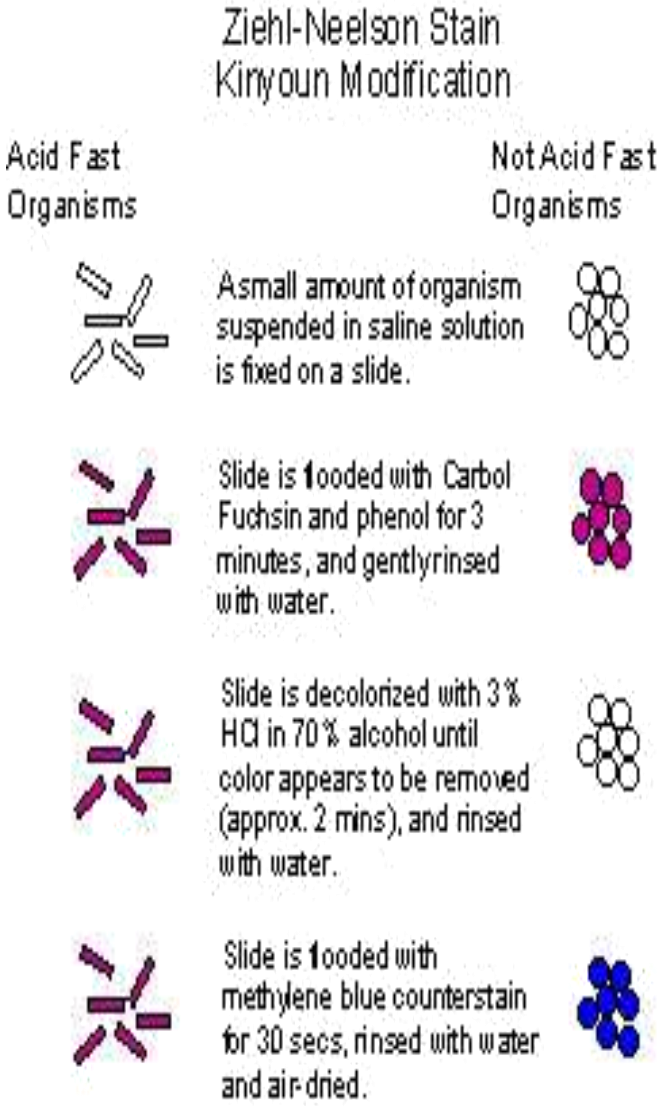
1. يحضر غشاء من المزرعة البكتيرية الحديثة ثم يثبت
2. يغمر الغشاء بصبغة كربول الفوكسين ويسخن السطح السفلي للشريحة حتى يتصاعد منها البخار (دون غليان الصبغة) لمدة من 3–5 دقائق (عدم جفاف الصبغة)
3. تغسل الشريحة تحت تيار ماء خفيف
4. يضاف الكحول الحامضي على الغشاء نقطة فنقطة تدريجيا مع إمالة الشريحة حتى تسقط القطرات عديمة اللون لمدة دقيقة
5. يغسل الغشاء تحت تيار ماء خفيف
6. يصبغ الغشاء بصبغة ازرق الميثلين لمدة نصف دقيقة
7. يغسل الغشاء تحت تيار ماء خفيف
8. تجفف الشريحة ثم تفحص تحت المجهر



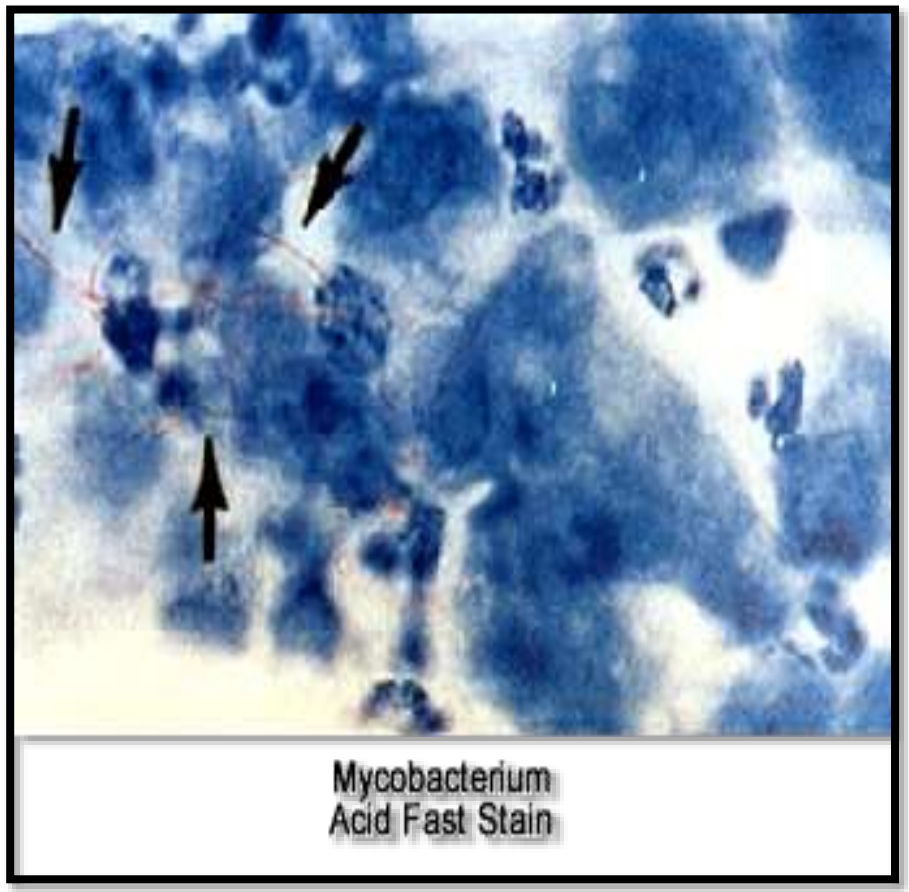
Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

الاختلاف بين البكتيريا المقاومة للأحماض والغير مقاومة للأحماض





- يرجع السبب الاساسي للاختلاف الى وجود تراكيز مرتفعة من الدهون في الاغشية السيتوبلازمية لخلايا البكتيريا المقاومة للاحماض، وهذه الدهون تمنع او تؤخر دخول الصبغة او خروجها
- ويعتقد ان وجود حمض الميكوليك **Mycolic acid** في البكتيريا المقاومة للاحماض بنسبة كبيرة من اسباب ايجابيتها



Mycobacterium
Acid Fast Stain