وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الأنبار – كلية الزراعة
قسم علوم الاغذية

أحياء الأغذية المجهرية/ عملي
المرحلة الثالثة

إعداد
م.م. بلال علي خشان
كلية الزراعة-قسم علوم الأغذية

طرق تقدير العدد البكتيري

- توجد عدة طرق يتم بواسطتها تقدير الاعداد البكتيرية في عينات الأغنية او المياه واهم هذه الطرق هي:

- العد بالأطباق القياسية (Standard Plate Count) ويعبر عنها بمختصر (SPC) وتعرف بطريقة العد غير المباشر .

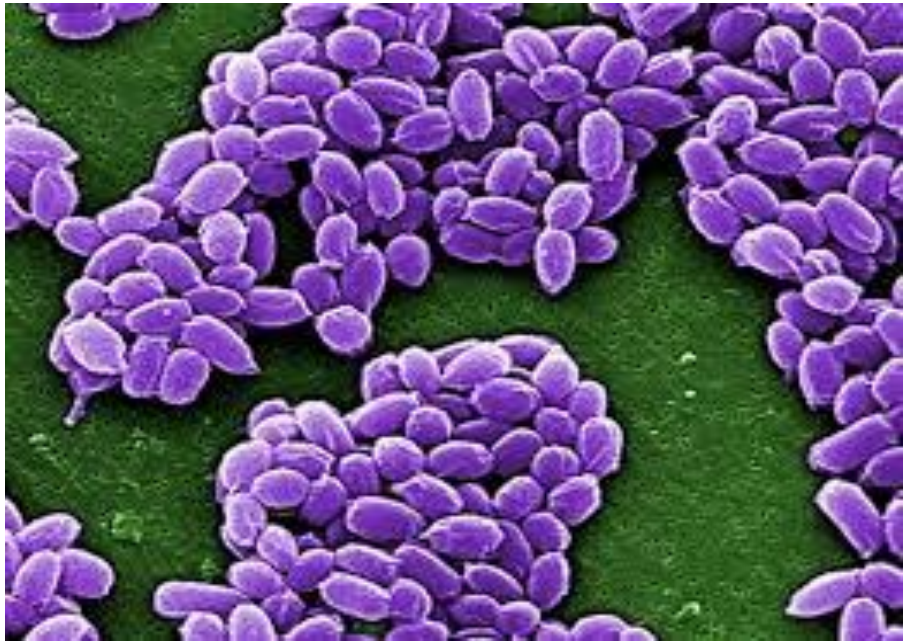
- العد المباشر بالمايكروسكوب (Direct Microscope Count) ويعبر عنها بمختصر (DMC).

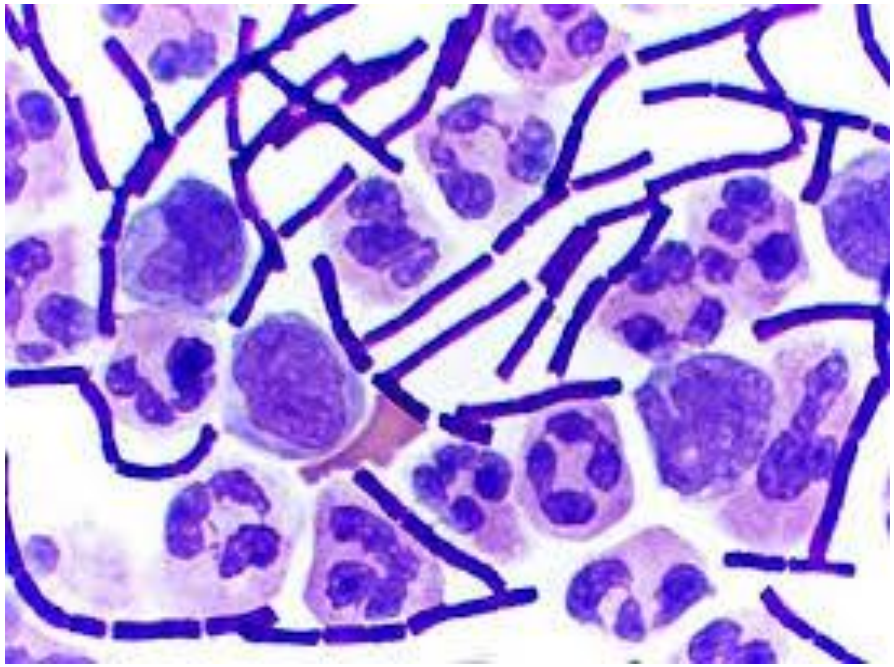
- العد الأكثر احتمالا (Most Probable Number) ويعبر عنها بمختصر (MPN) .

العد المباشر بالمايكروسكوب (Direct Microscope Count)

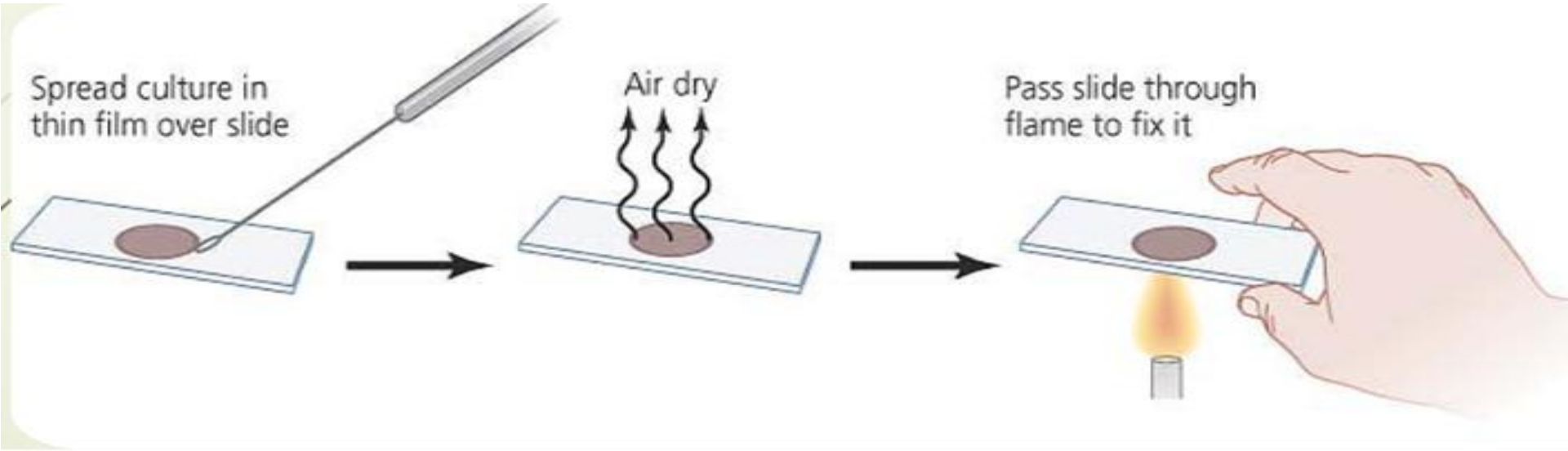
- تستخدم هذه الطريقة للأغذية السائلة وهي تختلف عن الطريقة السابقة بانها تعد كافة البكتريا الحية والميتة على عكس الطريقة السابقة التي تعد البكتريا الحية فقط.
- ومن المهم معرف استخدام المايكروسكوب جيدا.
- اهم ما تمتاز به هذه الطريقة:
- سريعة يمكن انجازها خلال ١٥ – ٣٠ دقيقة وتعتمد على مهارة وقدرة القائم بها .
- لا تحتاج الى اجهزة ومعدات كبيرة .

- **اما عيوب هذه الطريقة :**
- تعد الخلايا الحية والميتة في العينة .
- يتم حساب التجمعات البكتيرية (عناقيد ، مسبحية ، ثنائية) على انها خلية بكتيرية واحدة .



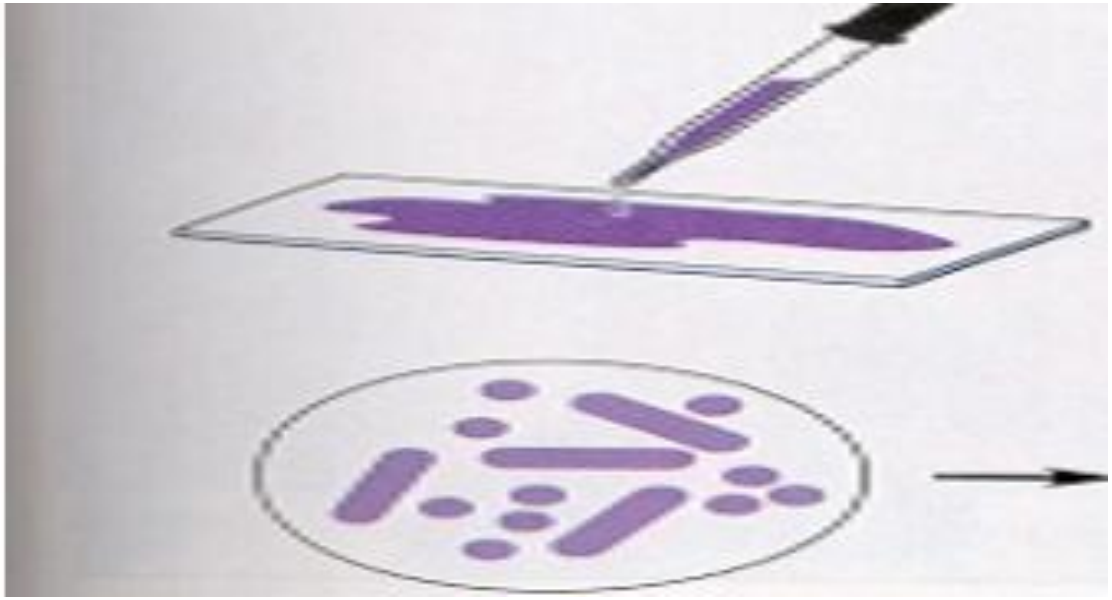


- **وتتلخص خطوات العمل فيها بما يلى :**
- **أولاً : تؤخذ شريحة خاصة لهذا الغرض تدعى شريحة Breed محدد عليها مساحة (١ سم٢) و بواسطة الناقل المعقم Loop او بواسطة شريحة خاصة او ماصة دقيقة خاصة يتم نشر حجم معلوم من النموذج المراد فحصة (العينة) أي ما يعادل ٠.٠١ مل على المساحة المعلومة (١ سم٢) ، ويتم تثبيت الغشاء (اي تثبيت الخلايا البكتيرية) ضمن هذه المساحة ثم يجفف هوائية (وفي حالة استخدام هذه الطريقة مع احد منتجات الألبان كاللبن مثلا يتم ازالة المواد الدهنية قبل تجفيف السلايد وذلك باستخدام احد المذيبات العضوية كالزايلين).**

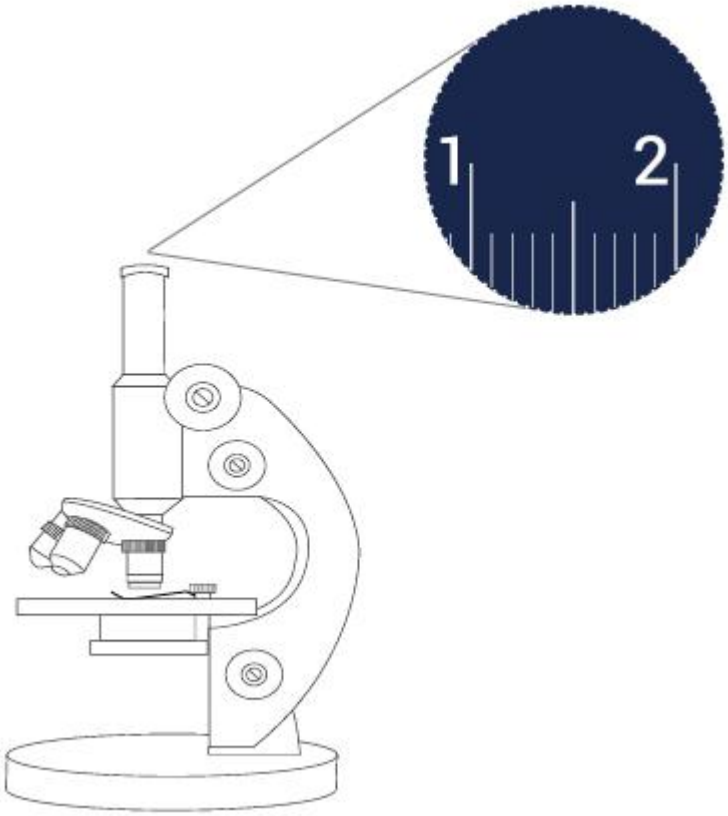


ثانيًا : تصبغ الشريحة تصبيغ بسيط اما باستخدام صبغة Crystal Violet Metheylene Blue , لمدة ٢-٣ دقيقة ثم تشطف الشريحة بالماء لازالة الصبغة الزائدة وتجفف هوائيا .

. Crystal violet



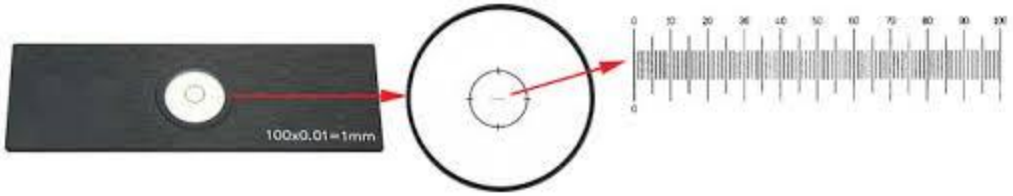
ثالثًا : قياس قطر العدسة الزيتية و تحديد مساحة الحقل المجهري:



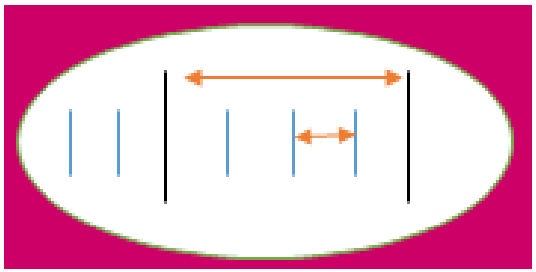
ان المساحة المحددة ١ سم٢ على الشريحة تحتوي بحدود ٤٠٠٠ حقل مجهري مما يصعب عدها في وقت واحد لذلك يتبع الاتي لحل هذه المشكلة:

يتم قياس مساحة الحقل المجهري (الحقل المجهري هو المساحة التي نراها من خلال العدسات العينية والصغرى أي بمعنى ان مساحة الحقل المجهري هي المساحة التي نراها من خلال العدسة)

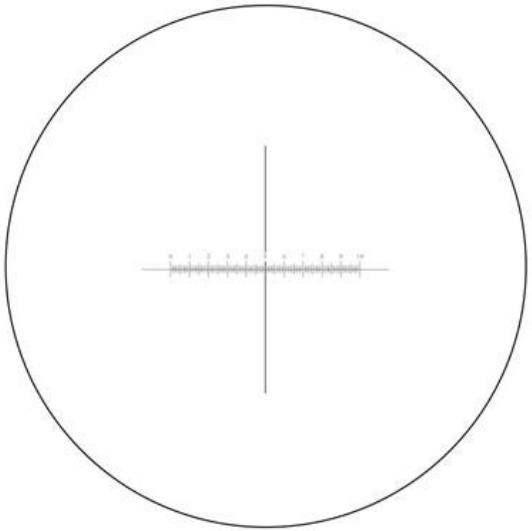
يتم تحديد مساحة الحقل المجهري بعد قياس قطر العدسة الزيتية المستخدمة في الفحص وذلك باستخدام شريحة زجاجية خاصة تسمي (Stage Micrometer شريحة مايكرومترية) توضع تحت العدسة الزيتية بعد وضع قطرة من الزيت عليها أن تحتوي هذه الشريحة على تدريجات وكالاتي :

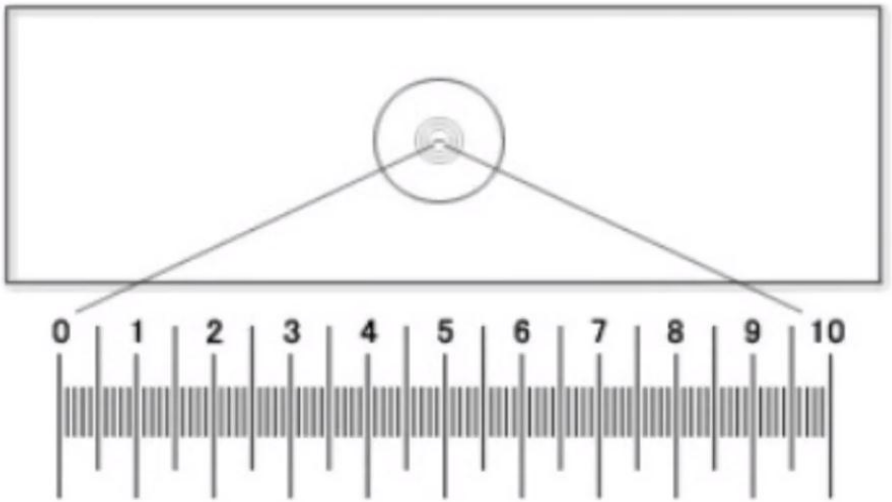


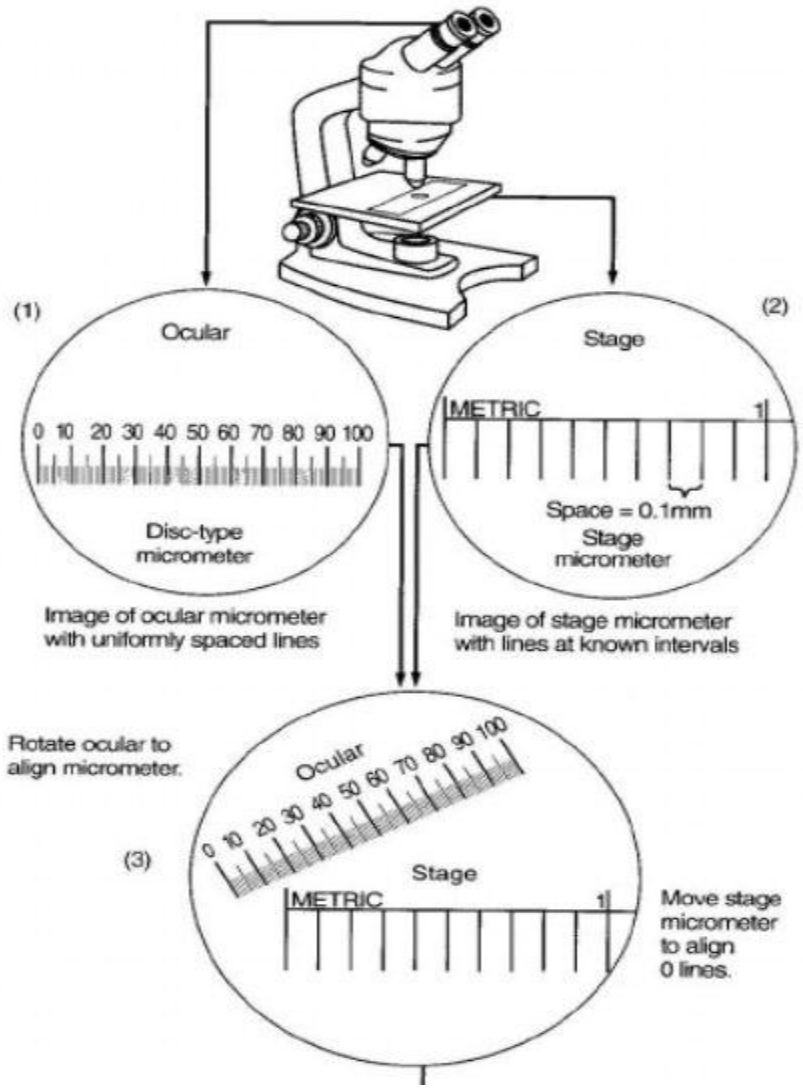
- المسافة بين كل خطين كبيرين تساوي ٠.١ ملمتر
- المسافة بين كل خطين صغيرين تساوي ٠.٠١ ملمتر

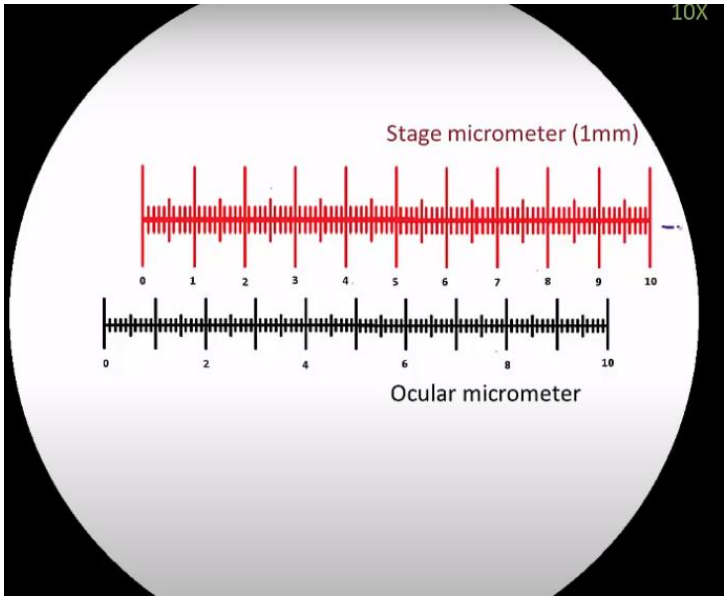


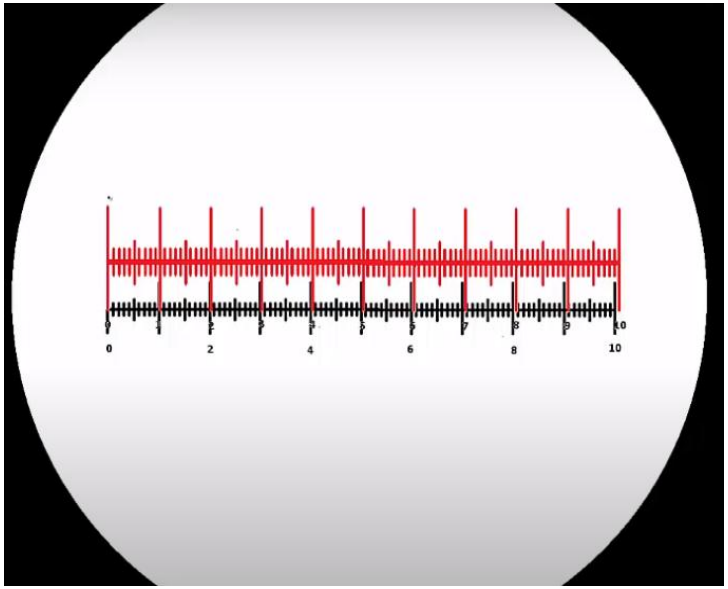
تحديد مساحة الحقل المجهري:

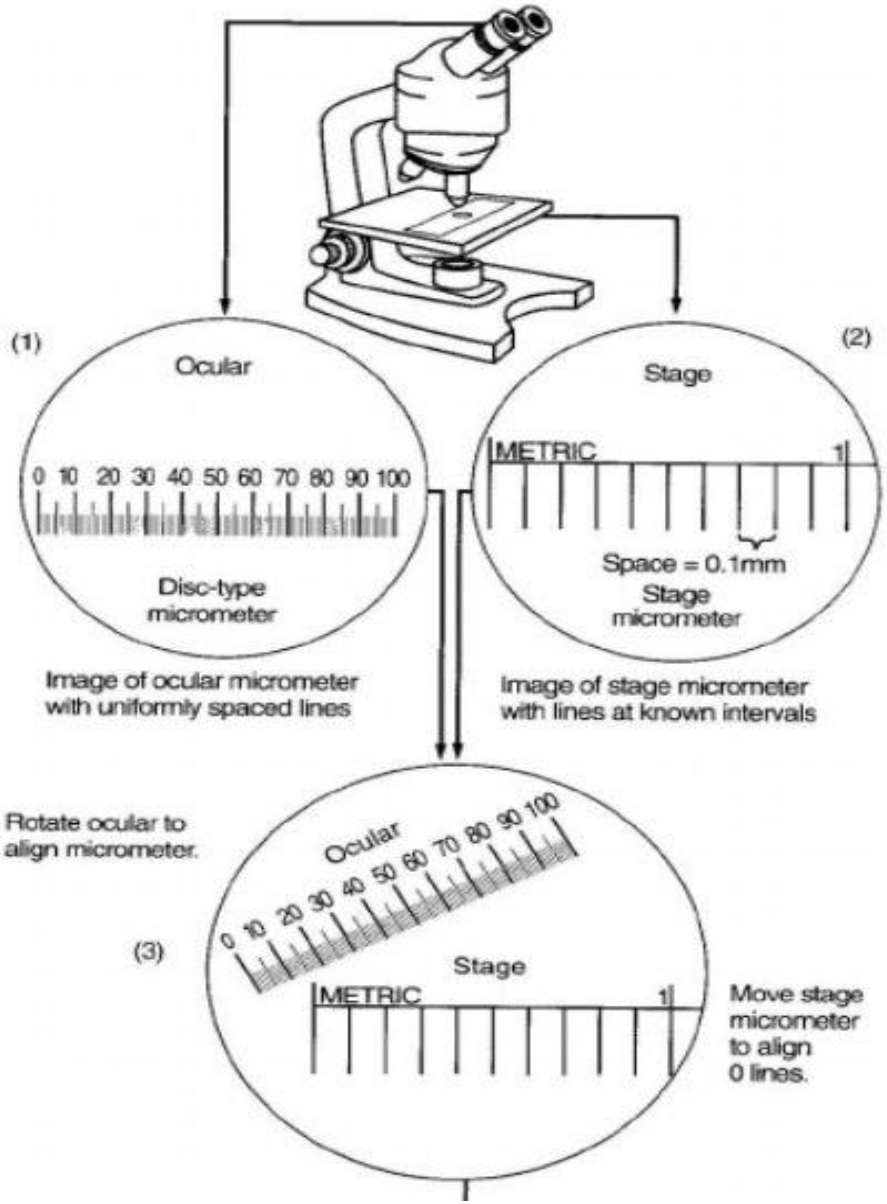




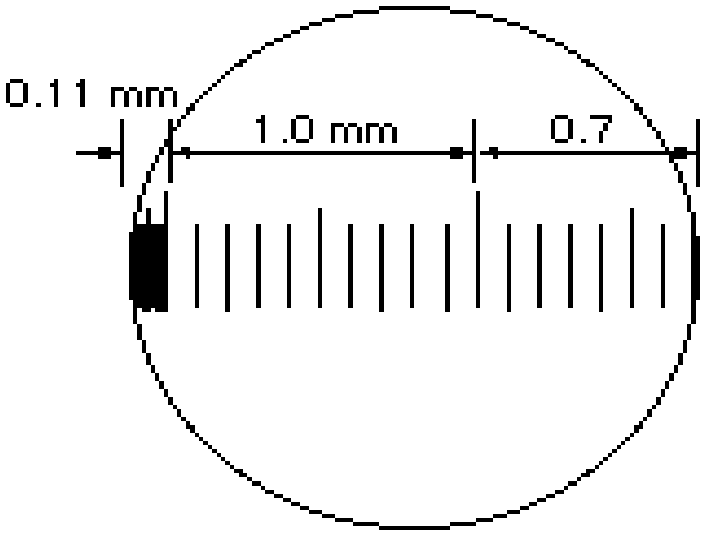



10X
Stage micrometer (1mm)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0 2 4 6 8 10
Ocular micrometer




(1)
Ocular
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Disc-type micrometer
Image of ocular micrometer with uniformly spaced lines
(2)
Stage
METRIC
1
Space = 0.1mm
Stage micrometer
Image of stage micrometer with lines at known intervals
Rotate ocular to align micrometer.
(3)
Ocular
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Stage
METRIC
1
Move stage micrometer to align 0 lines.

فعلى سبيل المثال



Diameter = 0.11 + 0.7 + 1.0 = 1.81 mm

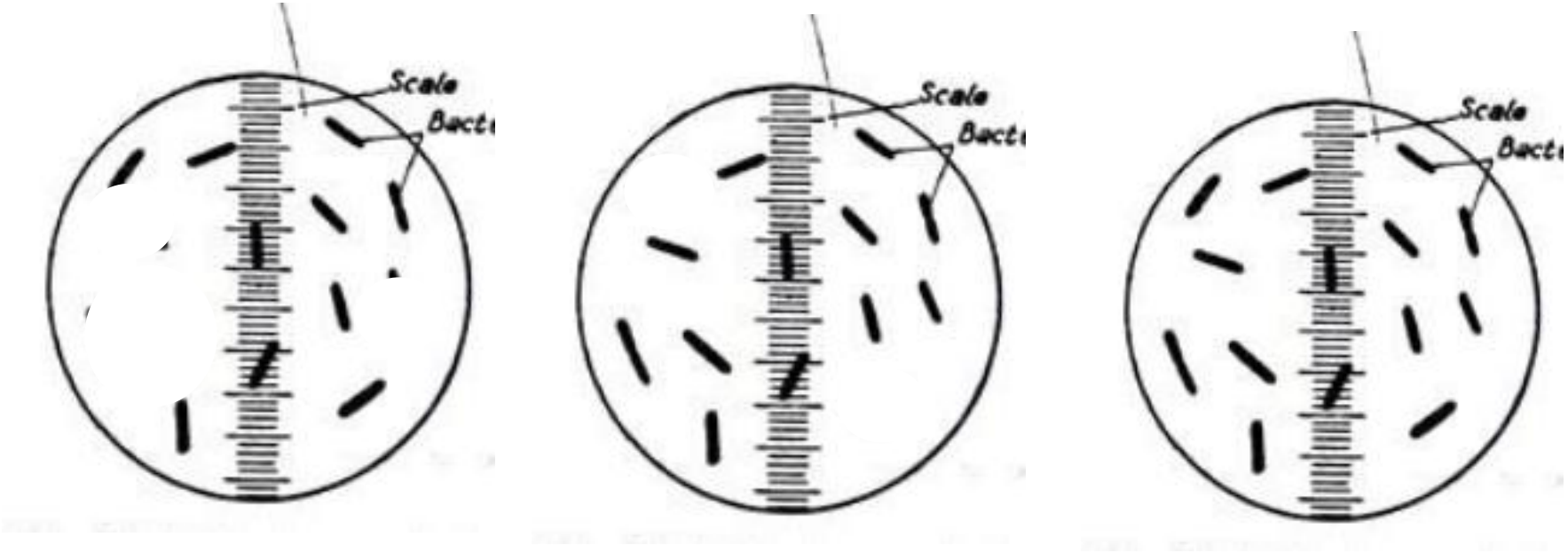
استخراج مساحة العدسة الزيتية (مساحة الدائرة = نق^{٢} × ط) والتي تمثل في نفس مساحة الحقل المجهري وهي المساحة التي نراها من خلال العدسة .

2.84= (0.905*3.14)

MF او معامل المجهر= ١٠٠/ مساحة الحقل المجهري (ملم).

MF = 40.32 mm

ثالثًا : تفحص تحت المجهر (بعد قياس قطر العدسة الزيتية) ويفحص عدد الحقول المجهرية ما بين ١٠ – ١٥ حقل يستخرج متوسط عند المايكروبات للحقل الواحد .



- رابعًا : بعد تقدير MF يتم استخراج معدل عدد البكتريا في الحقل الواحد وهو ما يعبر عنه بقيمة n

$$n = \frac{\text{عدد الخلايا المحسوبة في الحقول}}{\text{عدد الحقول}}$$

خامسًا : يستخرج العدد النهائي للخلايا والذي يعبر عنه بـ CFU لكل مللتر وذلك بتطبيق المعادلة :

- $CFU / ML = MF \times n$

- **المصادر :**
- **الدليمي،خلف صوفي داود.** (١٩٨٨) .كتاب علم الاحياء المجهرية الجزء العملي.
- رقم التسجيل168991 :
- رقم التسجيل168992 :
- رقم التصنيف576.163 :
- رقم المؤلف : د ٧٤٥
- مكان النشر والناشر :بغداد:جامعة بغداد
- عدد الصفحات: 264 ص