جامعة تكريت – كلية العلوم – قسم علوم الحياة

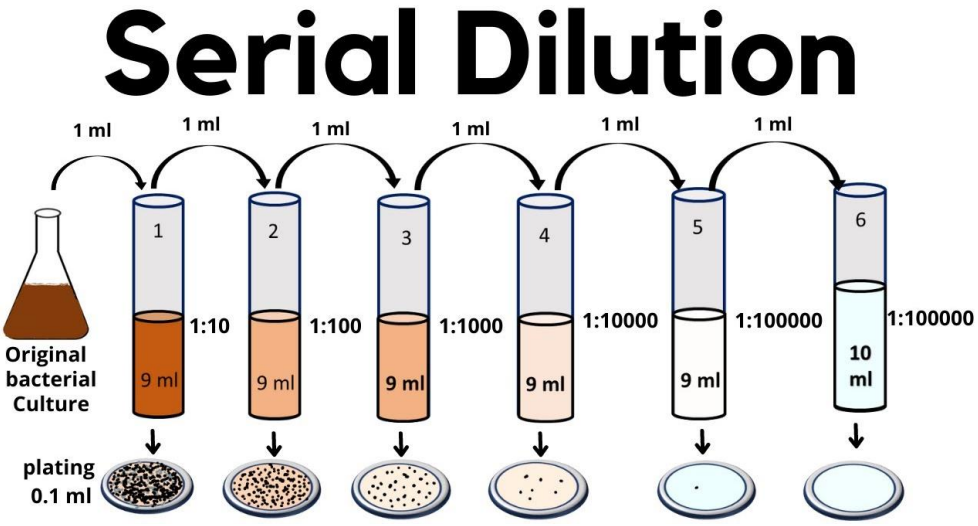
محاضرات بيئة الاحياء المجهرية العملي – المرحلة الثالثة - فرع الاحياء المجهرية 2022

مدرس المادة : م.د. شادمان طارق صادق **Lab 3**

تطبيق تجربة العد بالتخافيف والصب

سلسلة التخافيف

1- قم بتحضير 6 انابيب اختبار نوع Clear Plane tube مع تأشير المعلومات الخاصة بالعينة.
2- قم بإضافة 9 مل من الماء المقطر والمعقم بواسطة الاوتوكليف (بإمكان استعمال المحلول الملحي بدلا من الماء المقطر).
3- في حال عدم توفر معقم قم بملأ 6 انابيب نوع Buffy plane tube بالماء المقطر ليتم تعقيمها بواسطة الاوتوكليف.\
4- بعد تجهيز الانابيب الحاوية على الماء المقطر المعقم قم بنقل 1 مل من العينة السائلة الى الانبوبة رقم 1 ليصبح التخفي 10/1.
5- قم بنقل 1 مل من التخفيف الأول الى الانبوبة الثانية ليصبح التخفيف 100/1.
6- قم بتكرار الخطوة نفسها للأنابيب المتبقية للحصول على سلسلة التخافيف.

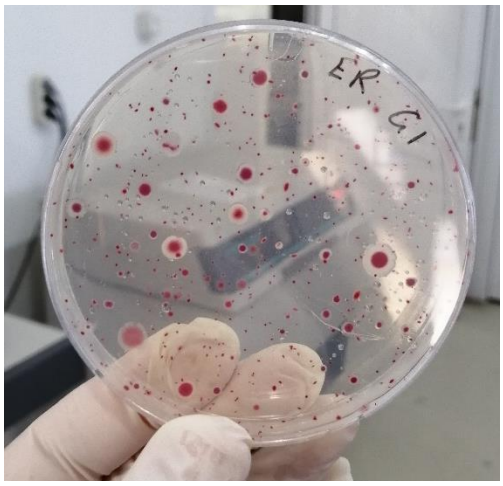


صب الأطباق

1- قم بتحضير وتعقيم وسط الاكار المغذي واتركه ليبرد الى درجة حرارة 45 .
2- قم بتحضير اطباق بتري على عدد التخافيف مع تعليمها بمعلومات العينة الأولية.
3- قم بنقل 0.1 مل (100 مايكروميتر) من كل تخفيف بواسطة الماصة الدقيقة Micropipette الى طب بتري فارغ مع التأكد من تعقيم الtips المستعمل مع الماصة أعلاه.
4- قم بصب الوسط الزرعي على العينة الموجودة داخل طبق البتري واغلق طبق البتري بغطاء الطبق.
5- قم بمزج العينة مع وسط داخل الطبق من خلال تحريك الطبق برفق على شكل رقم 8 للحصول على تجانس تام للعينة مع الوسط وانتظر لحين تصلب الوسط.

حضن الاطباق وحساب عدد المستعمرات

1- قم بوضع الاطباق في الحاضنة incubator بشكل مقلوب لمدة 24 - 48 ساعة.
2- بعد انتهاء مدة الحضن اخرج الاطباق وقم بحساب المستعمرات في كل طبق حيث المستعمرات الناتجة بالوحدات المكونة للمستعمرات Colony forming Units إ ان كل مستعمرة ناتجة من تضاعف خلية مفردة.
3- في حال تكرار التخفيف ل 3 مرات قم بتقسم المجموع المستعمرات على 3.
4- اعتمد في عملية الحساب الأطباق التي أعطت مستعمرات ما بين 30 – 300 مستعمرة وأهمل الاطباق خارج هذا المدى.
5- قم برسم جدول كما في ادناه لتدوين النتيجة.
6- المستعمرات الكبيرة والصغيرة وحتى المستعمرات الموجودة على الحواف تعامل بسواسية كونها نتجت مع خلية بكتيرية حية.
7- استعمل جهاز عداد المستعمرات Colony counter او أي أداة حساب لتلافي الخطأ الوارد أثناء الحساب.
8- لزيادة وضوح وتسهيل حساب المستعمرات الشفافة أضف 1 مل من محلول triphenyltetrazolium chloride (TTC) الى الوسط الزرعي قبل الصب (أي يضاف الى الوسط المعقم والمبرد وهو داخل الدورق المخروطي) حيث تضفي هذه المادة لون احمر فجلي للمستعمرات كما في الصورة ادناه.



وسط زرعي مضاف له محلول TTC تظهر فيه المستعمرات بلون احمر فجلي

تطبيق المعادلة وكتابة نتيجة الفحص

في حال تكرار التخافيف عندها يكون نص معادلة حساب العدد الكلي للبكتريا كما يلي

{عدد الخلايا البكتيرية في 1 مل = عدد المستعمرات / عدد المكررات x مقلوب التخفيف}

وفي حال عدم تكرار التخافيف يكون نص معادلة حساب العدد الكلي للبكتريا كما يلي

{عدد الخلايا البكتيرية في 1 مل = عدد المستعمرات x مقلوب التخفيف}

ويرمز للنتيجة بـ CFU/ml
Colony Forming Unit per milliliter

جدول كتابة نتاج العد البكتيري بطريقة التخافيف والصب

رقم العينة	التخافيف	عدد المستعمرات الناتجة	النتيجة (عدد الخلايا في 1مل)

مثال:

لو كان عدد المستعمرات الناتجة من زراعة العينة من التخفيف الثالث هي 150 فان النتيجة تكون كما يلي

عدد المستعمرات = 150

التخفيف = 1000/1

{عدد الخلايا البكتيرية في 1 مل = عدد المستعمرات x مقلوب التخفيف}

عدد الخلايا البكتيرية في 1 مل = 150 x 1000

عدد الخلايا = 150000 خلية أو 150000 cfu

ملاحظة: تطبق العملية والخطوات أعلاه لأي عينة مائية وفي حال كان المطلوب حساب العدد في عينة صلبة عندها يجب اذابتها ومجانستها ومن ثم عمل سلسلة التخافيف