طريقة عد الاحياء المجهرية بالتخافيف Plate count method

وهي من الطرائق غير المباشرة في عد البكتريا والفطريات والاحياء المجهرية الاخرى و تتميز بانها تحسب الخلايا الحية فقط وذلك من خلال تنميتها في وسط غذائي مناسب للكائن الحي المراد تقدير عدده في التربة او اي وسط اخر كالاغذية و الحليب وغيرها .

المواد و الأدوات المستخدمة

- انابيب اختبار نظيفة و معقمة
- ماصات زجاجية معقمة
- اوساط غذائية مختلفة
- اطباق بترية معقمة
- مصباح بنزن
- عينة تربة
- ماء مقطر

طريقة العمل

١- ناخذ ١ غم تربة ويضاف الى ٩ مل ماء مقطر او ١٠ غم الى ٩٠ مل ماء مقطر ، وترج الانبوبة رجا جيدا فيصبح هذا التخفيف ١:١٠ اي $١٠^{-١}$ فيصبح هذا التخفيف الاول.

٢- ينقل ١مل من التخفيف السابق بوساطة ماصة معقمة الى ٩ مل ماء مقطر فيصبح هذا التخفيف الثاني ١:١٠٠ اي $١٠^{-٢}$ ، وترج الانبوبة رجا جيدا .

٣- ينقل ١مل من التخفيف السابق ١:١٠٠ بوساطة ماصة معقمة الى ٩ مل ماء مقطر فيصبح هذا التخفيف الثالث ١:١٠٠٠ اي $١٠^{-٣}$، وترج الانبوبة رجا جيدا .

٤- نكرر الخطوات السابقة الى ان نصل الى التخفيف ١:١٠٠٠٠٠٠ اي $١٠^{-٦}$ مع مراعاة استبدال الماصة في كل خطوة بماصة جديدة و معقمة .

٥- يؤخذ من كل تخفيف ١مل ويوضع في طبق بتري معقم وفارغ ثم يصب الوسط الغذائي المبرد لدرجة حرارة ٤٥ م° _٥٠م ثم يحرك الطبق دائرياً على الطاولة ، او يصب الوسط الغذائي في الطبق البتري ثم يؤخذ ٠,١ مل من كل تخفيف ثم ينشر باستخدام الناشرشكل حرف (L) (Spreader) ثم يحرك دائرياً ، فنستخدم وسط Nutrient Agar لتنمية البكتريا و وسط Potato dextrose Agar للفطريات

٦- تنقل الاطباق البترية الى الحاضنة بدرجة حرارة ٢٨م لمدة ٢٤ ساعة للبكتريا و ثلاثة ايام – اسبوع للفطريات .

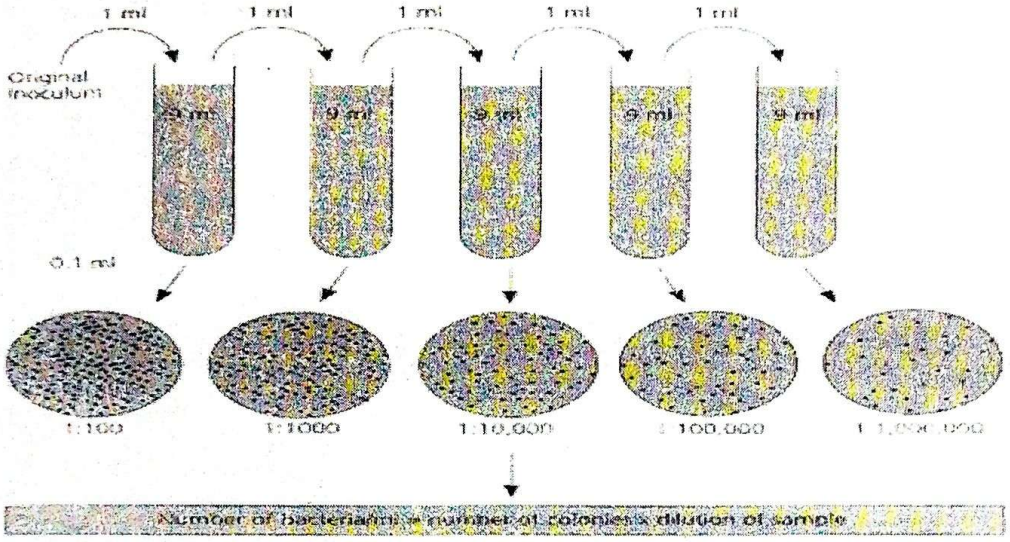
٧- نختار الاطباق الحاوية على نموات يمكن حسابها والتي تحوي على (٣٠_٣٠٠) مستعمرة ، بوساطة جهاز Colony Counter

٨- يحسب عدد الخلايا الحية في ١غم من العينة الاصلية بضرب متوسط عدد المستعمرات في الطبق في مقلوب التخفيف المستعمل ، اذا كان الحجم الماخوذ ١مل من التخفيف نتبع القانون التالي :-

عدد المستعمرات في الطبق

عدد الخلايا في ١ غم تربة = ـــــــــــــــــــــ X مقلوب التخفيف

حجم العينة الماخوذة



مثال : اذا كان عدد المستعمرات ٥ من التخفيف الخامس ١٠$^{-٥}$ اي ١:١٠٠٠٠٠

فان عدد الخلايا في ١ غم = ٥ X ١٠٠٠٠٠

٩- اما اذا اخذنا ٠,١ مل من التخفيف نطبق القانون الاتي :-

عدد المستعمرات في الطبق

عدد الخلايا في ١ غم تربة = ـــــــــــــــــــــ X مقلوب التخفيف

حجم العينة الماخوذة

٥

عدد الخلايا في ١ غم تربة = ـــــــــ X ١٠^{٥}

٠,١