تقدير معدل النمو الميكروبي بطريقة التخافيف والأطباق
Microbial growth by Dilution and plating

النمو growth:

في الاحياء الكبيرة يعني النمو زيادة في حجم الكائن الحي اما في الاحياء المجهرية فيعني زيادة عدد الافراد او الخلايا بطريقة الانقسام البسيط .

وتعد تقنية التخفيف والنشر على الاطباق هي الاكثر استعمالا لتقدير النمو الميكروبي وتتم بإجراء تخافيف لمزرعة بكتيرية معينة وزرع تلك التخافيف بطريقة النشر او الفرش على الاوساط الغذائية الصلبة في الطبق وتنمو كل خلية وتتحول بالانقسامات المتكررة الى مستعمرة، وكل خلية لها القابلية على الانقسام وتكوين مستعمرة في بيئة النمو تسمى Colony Forming Unit (CFU) كما يمكن قياس الامتصاصية لانابيب النمو وتقدير مستوى العكورة الناتجة عن االنمو الميكروبي ومقارنة النتيجة مع نتائج الزرع على الاطباق .

ولفهم نمو كائن مجهري معين يمكن زرع العزلة البكتيرية في دورق يحتوي وسط غذائي سائل تحت ظروف بيئية معينة .

ان النمو الميكروبي هو دالة الزمن لانه يمثل اطوار مختلفة من النمو في الاوساط السائلة وتمر البكتريا بـ 4 مراحل نمو متتالية وكما موضحة في الشكل (1-1) وهي :

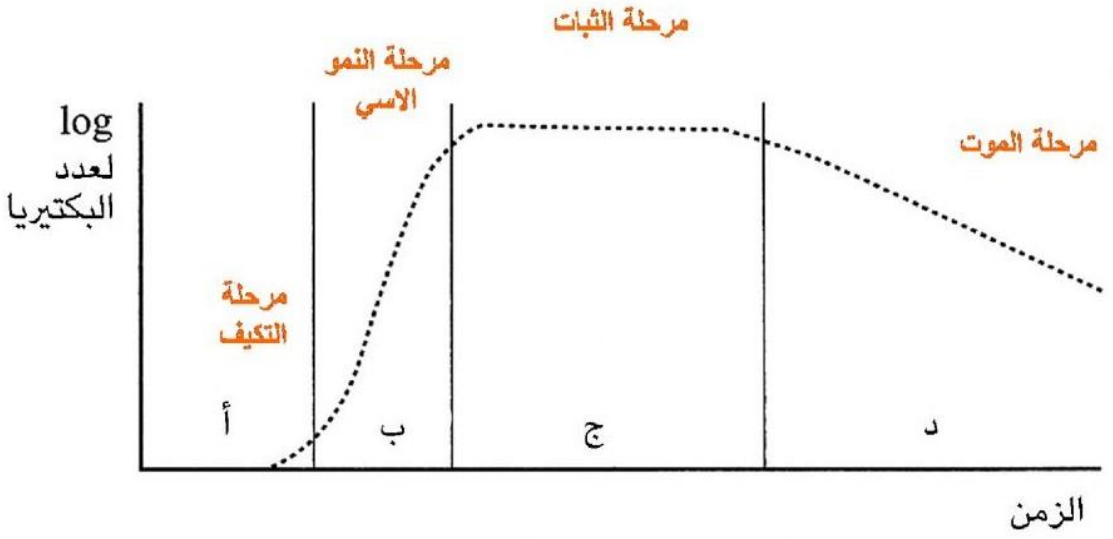
1- **طور التطبع او التأقلم Lag or adaptation phase** : عند تلقيح وسط زرعي في المختبر بنوع بكتيري معين تحت ظروف مناسبة فانه لايحصل انقساما لهذه الخلايا بل تبقى دون تغيير في اعدادها. وتبدأ بالتكيف للوسط ومن ثم تخليق الانزيمات والجزيئات الحيوية الضرورية للنمو .

2-طور النمو اللوغارتيمي او الاسي Log or logarithmic phase : في هذا الطور تبدا الخلايا بالتضاعف بشكل منتظم ومتسلسل وتكون الزيادة في اعدادها زيادة اسية بمرور الوقت وتكون الاحياء المجهرية هنا حساسة جدا للمؤثرات البيئية اكثر من الاطوار الاخرى . النمو البكتيري يمكن أن يوصف في شكل سلسلة رياضية: **1، 2، 4، 8، 16**،...ويمكن أن تكتب على النحو التالي

$$2^0, 2^1, 2^2, 2^3, 2^4, 2^5 \ldots$$

3-طور السكون او الثبات stationary phase : وفيه يقل معدل النمو بشكل ملحوظ ويصبح بطيء بسبب الاعداد الهائلة من الخلايا وقلة المغذيات وتراكم الفضلات (السموم) الايضية وتغيير في pH الوسط الزرعي ..

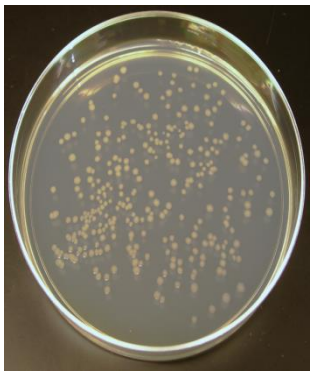
4-طور الانحدار او الموت Death or decline phase : تفقد الخلايا القدرة على الانقسام وتموت نفاذ المغذيات .



شكل (1-1) منحنى النمو البكتيري

المواد والادوات المطلوبة :

1- مزرعة بكتريا *E. coli*
2- 50 مل من وسط سائل Trypticase Soya Agar TSA
3- دورق مخروطي حجم 100 مل
4- ماصة دقيقة Microppipete
5- ناشر زجاجي



طبق بتري يحتوي مزرعة بكتريا *E.coli*

فلاسك يحتوي 50 مل وسطTSA

ناشر زجاجي

طريقة العمل :

1- نلقح وسط TSA السائل في الدورق ببكتريا *E.coli* ونحضن لمدة 24 ساعة بدرجة 27 °م

2- ناخذ من المزرعة النامية بعد التحضين (100µl) وتلقح في 250 مللتر وسط TSA السائل مرة اخرى في دورق جديد.

3- يرج الفلاسك جيدا لعدة ثوان ثم ناخذ منه (5 ml) وتوضع في انبوب اختبار حجم 10 مللتر وهنا يبرد بسرعة بوضعه مباشرة في الثلاجة عند درجة 4°م وهنا يعتبر الزمن الآني ويرمز له $\mathbf{T_0}$ ويساوي صفر وعدد الخلايا يساوي $\mathbf{5x10^5}$ CFU/ml .

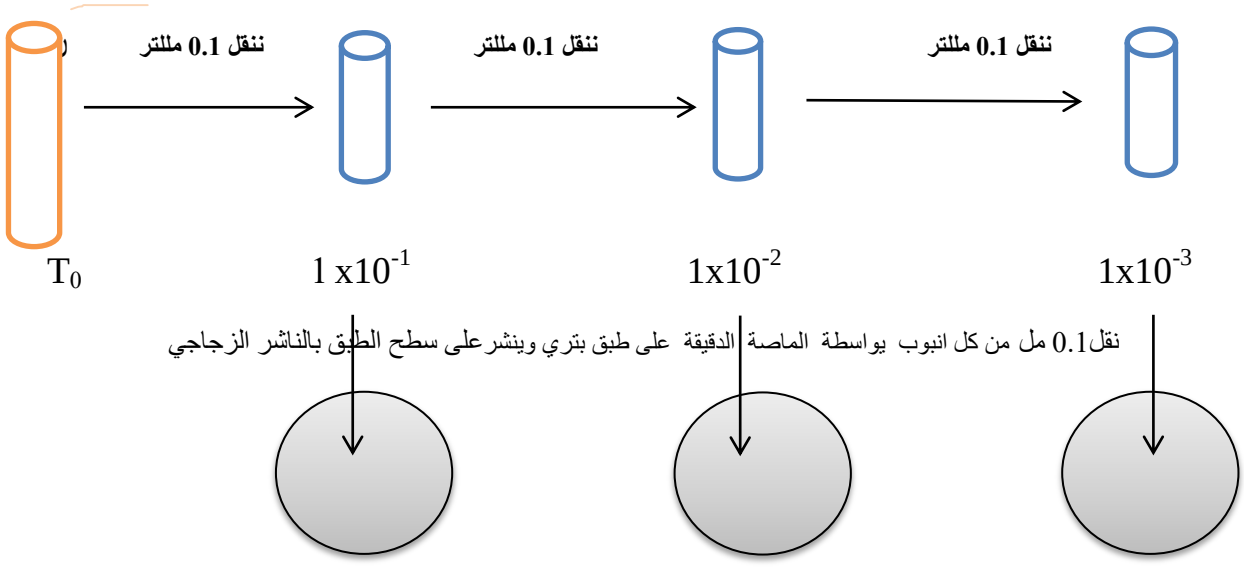
4- نحضن الفلاسك في الحاضنة الهزازة shaker بدرجة حرارة 37°م لمدة ساعة ثم ناخذ منه (5ml) وتوضع ايضا في انبوب اختبار وتوضع فورا في الثلاجة ويكون الزمن هنا $\mathbf{T_1}$= 1

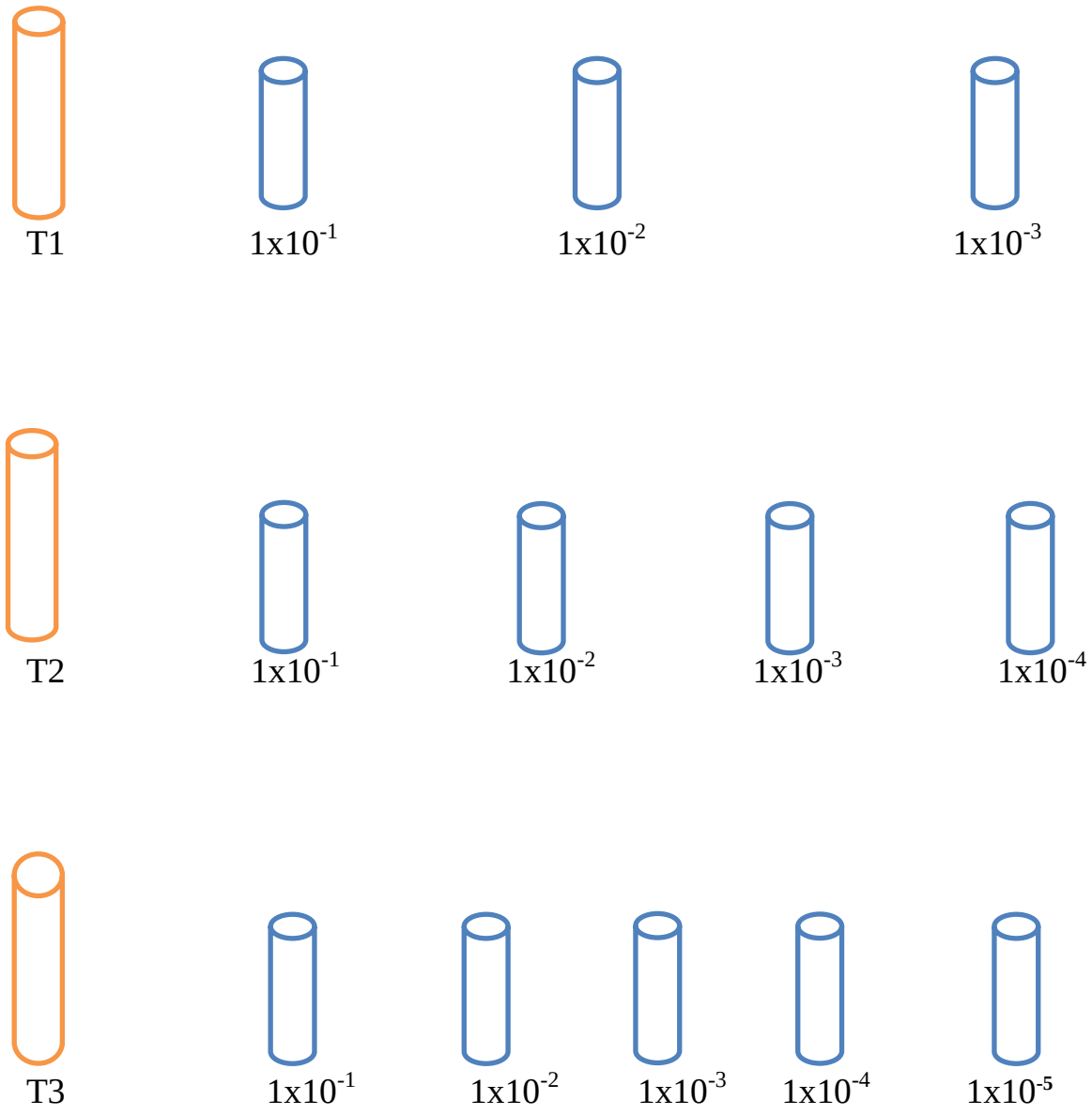
5- بعد بعد ساعتين من تحضين الفلاسك في الحاضنة الهزازة ناخذ ايضا (5ml) من المزرعة وتوضع في انبوبةاختبار وتبرد فورا بالثلاجة ويعتبر هنا الزمن $\mathbf{T_2}$ = 2

وهكذا بعد التحضين بـ 3 ساعات ناخذ 5 مللتر من المزرعة وتوضع فورا بالثلاجة ويعتبر الزمن T_3 = 3 وهكذا نستمر بعد كل ساعة والاوقات T_4, T_5, T_6, T_7, T_8

وكل الاحجام المأخوذة تخزن بالثلاجة بدرجة 4 درجة مئوية .

بعدها تحضر تخافيف عدد 7 من محلول الملح الفسيولوجي Normal saline بحجم 0.9 مللتر .





ونستمر بعمل تخافيف من كل انبوب محفوظ سابقا بالتبريد ونرج 5 ثوان عند نقل الحجم 0.1 من انبوب لاخر من اجل تجانس توزيع الخلايا في الانبوبة . ومن انبوبة T_4 نعمل ست تخافيف ومن انبوبة T_5 نعمل سبعة تخافيف ومن انبوبة T_6 نعمل ثمانية تخافيف اما الانابيب عند الزمن T_7 وT_8 فلا نأخذ ؟؟؟ وحسب الجدول التالي نعمل التخافيف :

مزرعة *E.coli*	التخافيف التي تزرع منها الاطباق		
T0	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
T1	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
T2	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
T3	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
T4	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
T5	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
T6	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}

ومن التخافيف اعلاه في الجدول نلقح من كل تخفيف 0.1 مللتر اطباق بتري حاوية وسط TSA الصلب وتنشر بواسطة الناشر الزجاجي على سطح الاطباق وتفرش لكي توزع الخلايا بصورة متباعدة على سطح الطبق. ويراعى تعقيم الناشر باللهب بين كل تخفيف واخر عند النشر .تترك الاطباق عدة دقائق لتجف ثم تحضن بصورة مقلوبة وتحضن بدرجة 37 °م لمدة يوم كامل .

اذا كان

عدد الخلايا البكتيرية عند الزمن صفر T_0 هو $X_\circ$= 1000 CFU/ml

فاذا طلب منا حساب عدد الاجيال n (عدد الانقسامات) عند ساعة معينة T من التحضين وكان عدد الخلايا في تلك الساعة هو X خلية فان القانون هو:

عدد الخلايا عند زمن معين $X = X_\circ \times 2^n$

$$2^n = \frac{x}{x_\circ}$$

بما ان الاس هو دالة اللوغارتيم نضيف اللوغارتيم للطرفين :

$$\mathbf{n}\, log 2 = log \frac{x}{x_\circ}$$

مثلا عند حساب عدد الاجيال عند الساعة السادسة 6 وكان عندها عدد الخلايا 16000 خلية فيكون الحل :

$$n \times \boldsymbol{log}2 = \quad log\frac{16000}{1000}$$

$$n \times 0.301 = \log 16$$

$$n = \frac{1.204}{0.301} = 4$$

زمن الجيل =**4 / 6** = 1.5

وهو الوقت المحصور بين انقسامين متتاليين