المختبر الاولى

إرشادات عامة للعاملين في مختبرات الأحياء المجهرية.
نبذة عن بعض الأجهزة والأدوات المتوفرة في مختبرات الأحياء المجهرية.
المجهر الضوئي المركب .

إرشادات عامة للعاملين في مختبرات الأحياء المجهرية:

- ارتداء الصدرية المختبرية النظيفة .
- عدم تداول المزارع البكتيرية أو مزارع الأحياء الدقيقة الا بإشراف مباشر من القائمين على التدريس .
- اتخاذ الحيطة والحذر عند استعمال الماصات لنقل الأحياء الدقيقة .
- غمر الماصات والأدوات الزجاجية المستعملة لنقل الأحياء الدقيقة في محاليل معقمة بعد الاستعمال .
- تعقيم الناقل الجرثومي loop قبل وبعد الاستعمال باللهب .
- تعقيم سطوح الطاولات .
- اتلاف المزارع البكتيرية غير الضرورية بالموصدة Auto clave .

نبذة عن بعض الأجهزة والأدوات المتوفرة في مختبرات الأحياء المجهرية:

- جهاز التعقيم البخاري (الموصدة) Auto clave :

يستعمل في تعقيم الأوساط الغذائية المستخدمة لتنمية الأحياء الدقيقة والسوائل المتحملة للحرارة . يتم التعقيم في هذا الجهاز بدرجة 121°م لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط 15باوند/انج مربع ، كما يستعمل هذا الجهاز لإتلاف المزارع التي انتفت الحاجة إليها .

- فرن جاف Dry oven:

يستعمل في تعقيم الزجاجيات بمختلف أنواعها من الماصات (بعد وضعها في علب الماصات) والأطباق petridish وغيرها . ينظم الجهاز على درجة حرارة 170 -180°م ويتم التعقيم خلال3-4 ساعة .

- الحاضنات Incubators:

تستعمل لحضن Incubation الأحياء الدقيقة وتنظيم حرارة الحاضنة حسب درجة الحرارة المثلى Optimum Temp للأحياء المجهرية قيد التنمية.

- المجهر الضوئي المركب Light Compound Microscope.
- عداد المستعمرات Colony Counter:

يستعمل في عد المستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية في الأطباق .

- حمام مائي Water bath ، قناني لتخفيف Dilution bottle ، أطباق بتري ، شرائح زجاجية glass slide ، غطاء شريحة Cover slip ، أنابيب اختبار Test tubes ، أنابيب درهام Durham tubes ، ثلاجة مهمة لحفظ الأوساط والمزارع البكتيرية والمحاليل والمواد التي يحتمل تلفها في ظروف الغرفة ، ملاقط ، سكاكين ، خلاط ، مصابيح بنزن كحولية أو غازية .

- إبرة التلقيح (ناقل جرثومي) inoculating loop:

وهي إبرة مصنعة من سلك البلاتينيوم بقطر24-26 كيج (guage) ، مثبتة لحامل حديدي وتكون نهايتها حلقة دائرية بقطر 2-3 ملليمتر ، طول الإبرة (السلك) يبلغ $2\frac{1}{2}$ إنج ، وقد تكون مصنعة من النيكروم Nichrome وهو ارخص من البلاتينيوم . تمتاز ابرة التلقيح بسرعة بلوغها حرارة الاحمرار عند تعرضها للهب (أي سهولة تعقيمها) وسرعة تبريدها ، وهي بمثابة اليد للعاملين في حقل الأحياء الدقيقة ، ينبغي الحرص الشديد عند الاستعمال لئلاً تكون سبباً في احداث التلوث وذلك من خلال تعقيمها قبل وبعد كل استعمال وتعريضها إلى اللهب وتجنب نفضها للتخلص من المواد العالقة عليها الا بعد التعقيم . ان هذه الإبرة اذا كانت مفتوحة النهاية (أي الحلقة) تسمى بـNeedle.

- أطباق بتري Petri – dish:

من الزجاجيات المهمة في مختبرات الأحياء الدقيقة تستعمل للأوساط الصلبة ويتألف من طبقتين أحدهما أكبر من الثاني ، ويسمى الأول بالقاعدة والثاني غطاء ويستوعب طبق بتري 15 مل من الوسط الزرعي ، تحضن أطباق بتري في الحاضنة بصورة مقلوبة لمنع تبخر الماء من الوسط وتكاثفه على السطح الداخلي للغطاء وتساقطه على سطح الوسط ثانية مما يتسبب في امتزاج أو تداخل المستعمرات البكتيرية ويعيق عملية عزل المستعمرات بصورة نقية وتدعى هذه الحالة بالتلوث الداخلي .

Tell me and I will forget.
Show me and I might remember.
Involve me and I will understand
. OLD CHINESE PROVERB

المختبر الثاني **المجهر الضوئي المركب**

Light Compound Microscope

مقدمة عامة :

يستعمل المجهر الضوئي المركب وهو أبسط أنواع المجاهر لتكبير صورة الأحياء الدقيقة أو الأشياء المراد فحصها به عدة مرات لتسهيل دراستها . ولا يخلو مختبر من مختبرات الأحياء الدقيقة من هذا النوع من المجهر أو غيره ذلك لأنه بمثابة العين للميكروبيولوجي التي يرى بها الأحياء الدقيقة التي توصف بأنها كائنات دقيقة لا ترى بالعين المجردة .

ويذكر ان عين الإنسان لا تستطيع تمييز الأشياء التي تقل أقطارها عن ملليمتر واحد وان قطر البكتريا وطولها أحياناً يقل في الغالب عن 1µM (مايكروميتر = 10^{-6} من المتر) .

ولا يختلف المبدأ الذي يعمل بموجبه المجاهر الضوئية المركبة الحديثة عن تلك التي قام زكريا يانسون Zacaharias Jenson وهو صانع نظارات هولندي من ابتكارها في حدود عام 1590 ذلك باستخدام عدستين تقوم الثانية (العدسة العينية) بتكبير الصورة الناشئة من العدسة الأولى (العدسة الشيئية) واستطاع بذلك الحصول على قدرة تكبير إجمالية قدرت بحوالي 100-50مرة .

وهذا هو المبدأ الأساسي الذي تقوم عليه صناعة المجاهر حالياً مع ما طرأ من تطورات على صناعة العدسات نفسها وما رافق ذلك من زيادة قوة التكبير وقوة التمييز .

يتركب المجهر الضوئي المركب من مجموعتين من الأجزاء وكما موضح في الشكل (1- أ)، هما :

- أولاً : الأجزاء الميكانيكية Mechanical parts

وهذه الأجزاء هي :

1- انبوبة جسم المجهر body tube وقد تسمى بانبوبة العدسة العينية Ocular tube وهو تركيب انبوبي يحمل في نهايته العليا العدسة العينية ويتصل من الأسفل بالقرص الدوار .

2- القرص الدوار: وقد يسمى بالقطعة الأنفية الدوارة Revolving nose piece، وهو ترتيب يحمل العدسات الشيئية ويمكن تدويره لتغيير مواقع هذه العدسات .

3- الذراع Arm: ويربط معظم أجزاء المجهر بعضها بالبعض الآخر، ويحمل المجهر من الذراع باليد اليمنى ووضع راحة اليد اليسرى تحت القاعدة .

4- القاعدة Base: وهو التركيب الذي تستند عليه أجزاء المجهر كافة ويحتوي على مصدر للإضاءة الذي هو يتألف من مصباح كهربائي أو مرآة لامة توجه بزاوية معينة بحيث تعكس الضوء الساقط عليها باتجاه العينية على الشريحة الزجاجية ومنها باتجاه العدسة الشيئية .

5- المسرح Stage : وهو تركيب مسطح ومستو يقع بين المكثف والعدسات الشيئية توضع عليه الشريحة الزجاجية ويزود المرح بعدد من الماسكات Clips لتثبيت الشريحة وقد تكون هذه الماسكات متحركة بوساطة منظم جانبي للتحكم بحركة الشريحة فوق المرح . تتوسط المرح فتحة لمرور الضوء عبره من مصدر الإضاءة باتجاه العدسة الشيئية ماراً بالعينة .

6- المنظم التقريبي والدقيق Coarse & Fine Adjustment : وهما تركيبات على هيئة عقدة أو عجلة يقعان على الذراع يستخدمان لرفع المرح أو خفضه بغية الحصول على صورة واضحة للعينة . وفي بعض المجاهر فان هذان التركيبات يتحكمان على حركة أنبوبة المجهر وليس على حركة المرح .

ويحرك المنظم التقريبي والخشن كما يسمى أحياناً ، المرح لدرجات واضحة أما المنظم الدقيق فيستخدم لتحريك المرح بحدود ضيقة غير مرئية وقد يكون المنظمات متحدين في منظم واحد يقوم بعملهما معاً .

- ثانياً : الأجزاء البصرية او العدسات Lenses

1- المكثف Condenser : ويقع تحت المسرح ويقوم بتجميع الضوء وتكثيفه على الحقل المجهري Microscopic Fieldلتحسين الإضاءة فيمكن الحصول على رؤيا واضحة ، وللمكثف منظم خاص به لتحريكه إلى الأسفل والأعلى وحسب متطلبات درجة الإضاءة المطلوبة .

ويحتوي المكثف على الحاجب Diaphragm الذي يتركب من مجموعة من الحلقات المعدنية التي يمكن التحكم بدرجة تداخلها وبالتالي تحديد حجم فتحتها لتحديد كمية الضوء المار من مصدره باتجاه المكثف .

2- العدسة العينية Ocular lens : وتسمى بالقطعة العينية eyepiece أحياناً وتقع في نهاية انبوبة جسم المجهر وهي عدسة واحدة او عدستين تقعان على مستوى واحد في المجاهر ثنائية العدسة العينية تقومان مقام عدسة واحدة . وسميت هذه العدسة بالعينية لأنها تكبر الصورة الناتجة عن العدسة الشيئية وتوصلها للعين التي تكون قريبة منها عند استعمال المجهر لرؤية العينة .

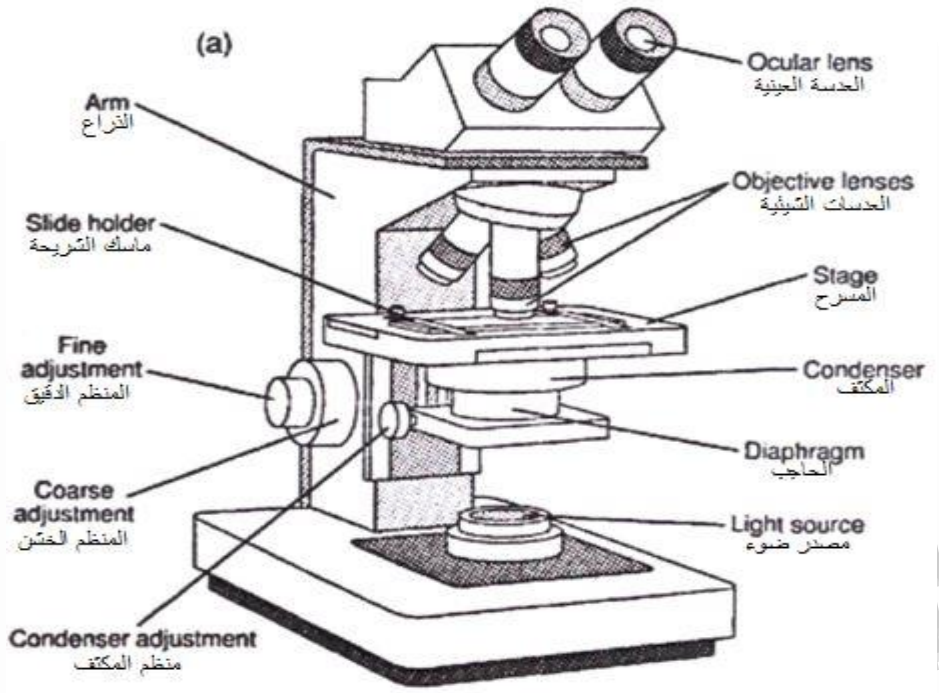
3- العدسات الشيئية Objective lenses:

وهي على أنواع ترتبط بالقرص الدوار ، وكما موضح أدناه مع قوة تكبير كل منها .

نوع العدسة الشيئية	قوة التكبير	مسافة عمل العدسة (ملليمتر)
Low power objective lens	10X	5
High power objective lens	40X	0.46
Oil immersion objective lens	100X	0.13
العدسة العينية Ocular lens	10X أو 15X	~

مسافة عمل العدسة Working distance:

هي المسافة الكائنة بين العينة قيد الفحص او الشريحة الزجاجية وبين العدسة عندما تكون صورة العينة في أوضح حال .



شكل (1- أ): المجهر الضوئي المركب بأجزائه المؤشرة

حساب قوة التكبير:

ولحساب التكبير الكلي للجسم المراد فحصه تحت المجهر اتبع الطريقة التالية:

1- لاحظ قوة تكبير العدسة العينية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو عادة (10) مرات (10 x).

2- لاحظ قوة تكبير العدسة الشيئية بقراءة الرقم المكتوب عليها وهو يختلف باختلاف العدسات الشيئية، ولنفرض أنك استعملت العدسة الشيئية الكبرى التي قوة تكبيرها عادة (40) مرة (40 x) فان قوة التكبير الكلية للجسم = العدسة العينية × العدسة الشيئية

= 40 x × 10 x

ملاحظات :

- يمكن تمييز العدسة الزيتية عن بقية العدسات الشيئية بوجود حلقة سوداء تحيط بها .
- يذكر ان العدسة الزيتية Oil immersion lens لا يمكن استعمالها الا بوضع الشريحة لمنع انكسار الضوء عن مساره وتشتته ومنع انحرافه خارج العدسة العينية مما قد يتسبب في عدم رؤية العينية بصورة واضحة لأن مسافة عمل العدسة الزيتية تبلغ 0.13 ملليمتر وان فتحة هذه العدسة صغيرة جداً، كما موضح في الشكل (1- ب).

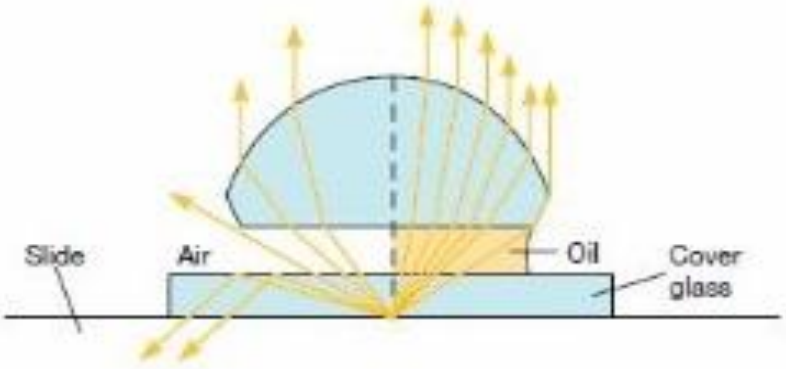
ويرجع سبب استخدام زيت السيدر تحديداً إلى ان معامل انكساره يبلغ N=1.52 وهو مساو لمعامل انكسار الضوء للشريحة الزجاجية .

- تقدر قوة تكبير المجهر = قوة تكبير العدسة العينية × قوة تكبير العدسة الشيئية

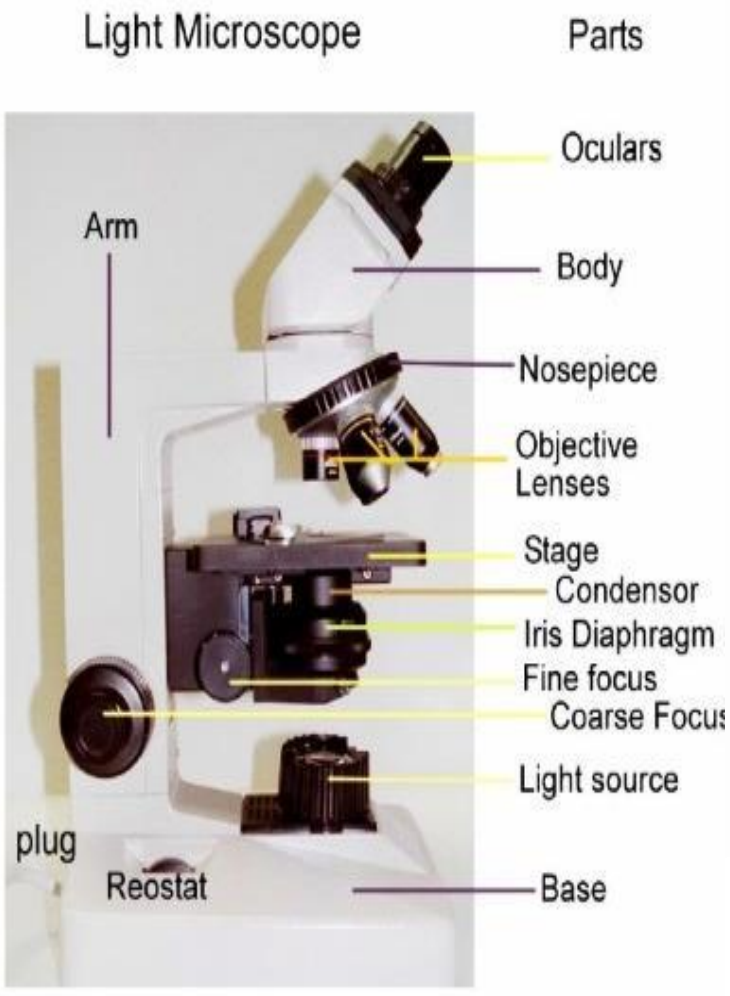
أما قوة تكبير العدسات الشيئية فتكون مدونة على العدسات نفسها .

- ينبغي تنظيف العدسة الزيتية بعد الانتهاء من استعمال المجهر بالزايلول أو الزايلين Xylene وورق النشاف lens paper لإزالة الزيت من العدسة .

The Oil Immersion Objective. An oil immersion objective lens operating in air and with immersion oil. Light rays that must pass through air are bent (refracted), and many do not enter the objective lens. The immersion oil prevents the loss of light rays.



شكل (1- ب): دور زيت السيدر في منع تشتت الضوء عند استعمال العدسة الزيتية



المختبر الثالث

Sterilization methods طرائق التعقيم

المقدمة:

يتطلب العمل في مختبرات الأحياء الدقيقة ان يكون كل شيء يتعامل معه أو يستخدمه العاملون في هذه المختبرات معقماً أي خالياً من كافة أشكال الحياة الحية . ونظراً لتنوع الأدوات التي تستخدم في مثل هذه المختبرات فقد تنوعت طرائق التعقيم هي الأخرى .

وهناك أسلوبان للتخلص من آشكال الحياة الحية هما :

1- القتل والإبادة Killing

إذ تستخدم أساليب أو طرائق تؤدي إلى قتل أو إبادة الكائنات الحية مع بقاءها في المادة المعقمة .

2- الفصل أو الإزالة Separation

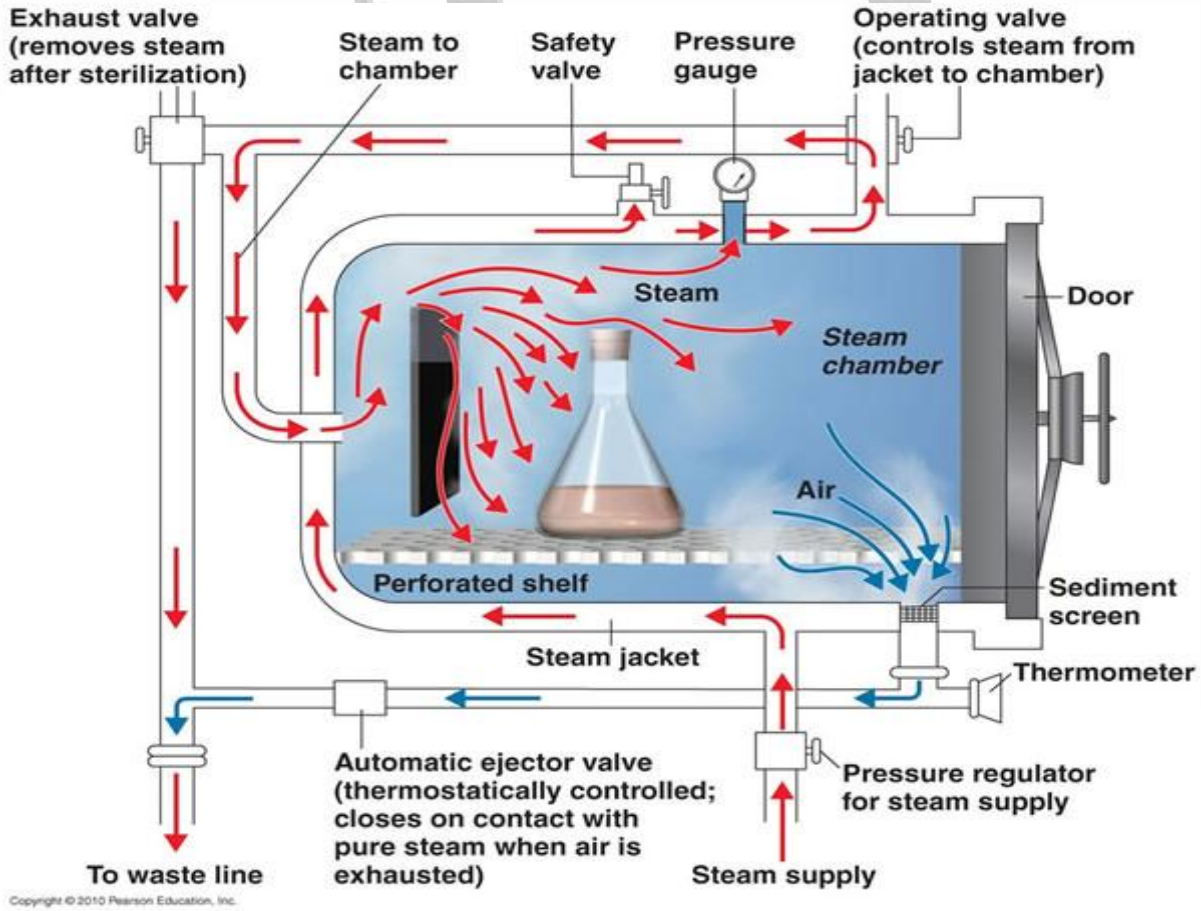
وفيه تستخدم طرائق وأساليب من شأنها ان تعمل على إزالة أو إزاحة الكائنات الحية من على المواد قيد التعقيم .

- طرائق التعقيم بالإبادة

أولاً : الحرارة Heat وهذه على أنواع :

أ - الحرارة الرطبة moist heat ومن الأمثلة عليها الطرائق الآتية :

- جهاز التعقيم البخاري Autoclave ويستخدم لتعقيم الأوساط الغذائية والمحاليل المتحملة للحرارة العالية في درجة 121°م لمدة 15-20 دقيقة .



- طريقة آرنولد (التعقيم المتقطع) Arnold method

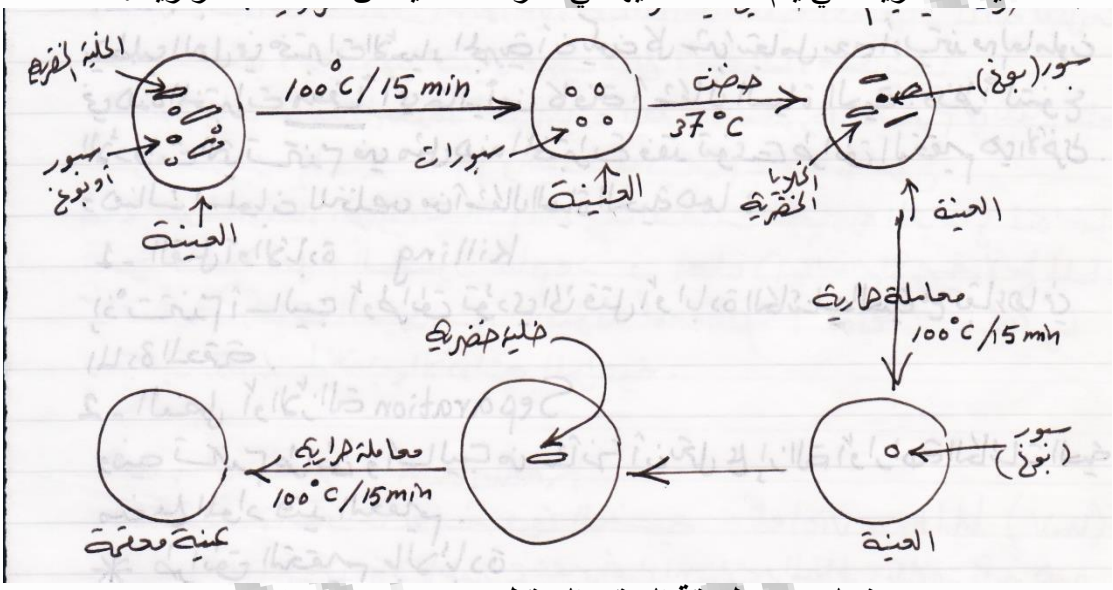
وهي طريقة ابتكرها Tyndall لذلك تسمى أحياناً بالتندلة Tyndalization بعد أن ادرك هذا الباحث بأن بعض البكتريا تتواجد بشكلين هما : الخلايا الخضرية والأبواغ أو السبورات وان الأخيرة تتميز بمقاومتها للحرارة . تتخلص طريقة التعقيم هذه بمعاملة المادة قيد التعقيم في 100°م في جهاز آرنولد وبالحرارة الرطبة (بخار) ثم تبريد النموذج لمدة 24 ساعة في 37°م وإعادة معاملته في 100°م / 15 دقيقة مرة أخرى وحضنه تحت الظروف نفسها ومعاملته للمرة الثالثة بدرجة حرارة نفسها وحضنه ثالثة وتحت الظروف نفسها أيضاً .

بعد هذه المعاملات الثلاثة تغدو المادة معقمة خالية من الخلايا الخضرية ومن الأبواغ .

يمكن تلخيص المبدأ الأساس في إبادة الأحياء الدقيقة ولاسيما البكتريا وأبواغها بما يأتي:

في اليوم الأول: أي معاملة الحرارية الأولى يتم القضاء على الخلايا الخضرية وحدها واثناء فترة الحضن الأولى تنمو الابواغ وتتحول إلى الخلايا الخضرية.

في اليوم الثاني: أي المعاملة الحرارية الثانية يتم القضاء على الخلايا الخضرية (المتكونة من الابواغ) وعند الحضن بعد المعاملة الثانية تتحول ما يحتمل بقائها من الأبواغ إلى الخلايا الخضرية التي يتم القضاء عليها في المرحلة الثانية من المعاملة الحرارية .



شكل (2): طريقة التعقيم المتقطع Arnold method

وتستخدم طريقة آرنولد في تعقيم المحاليل التي لا تتحمل حرارة أكثر من 100°م . ويمكن خفض حرارة المعاملة مع اطالة الفترة .

ب - الحرارة الجافة Dry Heat

- الفرن Oven : ويستخدم التعقيم الزجاجيات كأطباق بتري Petri dish والماصات (حيث توضع في علب خاصة بالماصات) وفي درجة 160°م لمدة 3 ساعات أو 180°م لمدة 1.5 ساعة ، وقد تسمى بطريقة الهواء الحار Hot air .
- اللهب Flame أو الحرق incineration وفي هذه تعرض المواد قيد التعقيم إلى لهب بنزن مباشرة مثل : Loop و Needle أو الملقط أو فوهات أنابيب الاختبار . ويذكر ان المنطقة المحيطة باللهب وبمحيط قدره 25-30 سم بشكل اللهب عندها منطقة معقمة بحكم عاملين هما : حرارة اللهب وحركة اللهب لذلك نجد بأن العاملين في حقل الأحياء الدقيقة غالباً ما يعملون حول

لهب بنزن عند تلقيح الأحياء الدقيقة أو زرع الأوساط وغيرها وفي غرف أو كابينات خالية من تيارات الهواء .

ثانياً : الكيمياويات Chemicals

مثل الكحولات وخاصة الكحول الأثيلي ويستخدم بتركيز 70% كمبيد للخلايا الخضرية وليس له تأثير على الأبواغ . وتتخلص تأثيراته في مسخ البروتينات الخلوية وإزالة المواد الدهنية وإذابتها لاسيما من الغشاء السايتوبلازمي وسحب الماء من الخلية وتجفيفها . كما انه يقلل من الشد السطحي ويزيل خلايا الأحياء الدقيقة من على الأسطح الماء ميكانيكياً .

والهالوجينات هي الأخرى تعد من الكيمياويات المعقمة كالكلور الذي يستخدم في تعقيم مياه الشرب وبتركيز $\frac{1}{2} - 2$ ppm واليود الذي يستخدم في تعقيم الجروح .

اما في مختبرات الأحياء الدقيقة فتستخدم العديد من المنظفات الكيمياوية التي تباع تحت تسميات تجارية مختلفة مثل : السيبتول Septol و Detol في تعقيم الأرضية والأسطح الملساء كما تستخدم مركبات الفنيول مثل : الفينول Phenol ، Cresol ، Lysol وبتركيز 15% لتعقيم الأدوات الجراحية .

ثالثاً : الإشعاع Radiation

ومن أكثر الأشعة استخداماً فوق البنفسجية Ultra Violet (U.V) وبطول موجي أقل من 350 نانومتر في تعقيم أجواء المختبرات والمطاعم ويتلخص تأثير هذه الأشعة في احداث طفرات وراثية من خلال تكوين ما يعرف بـThymine dimmers بين اثنتين من الثايمينات المتجاورة على أشرطة DNA . وتستخدم الإشعاعات المرئية مثل X-Ray أو يعرف بالأشعة السينية وأشعة كاما والأشعة الكونية Osmic في عمليات التعقيم أيضاً مع ضرورة أخذ الحيطة والحذر عند استخدام هذه الإشعاعات لكونها تالفة للأنسجة وتسبب أضراراً للإنسان مثلما تسبب أضرار للأحياء المجهرية.

طرائق التعقيم بالإزالة :

تستخدم في هذه الطرائق أنواع مختلفة من المرشحات التي تمرر من خلالها السوائل أو المحاليل المراد ترشيحها فتعمل المرشحات على احتجاز الأحياء الدقيقة وحسب نوع أوراق او أغشية الترشيح المستخدمة وحجم ثقوبها وتسمح بالسوائل أو المحاليل بالمرور خالية من الأحياء الدقيقة ومن أهم الأغشية المستخدمة لهذا الغرض membrane Filters ويقدر حجم ثقوبها بحوالي 0.45 مايكروميتر وهي كافية لاحتجاز جميع أنواع الأحياء الدقيقة ومنها البكتريا (باستثناء الفايروسات) وهي مرشحات مصنعة من خلات السليلوز ، ومن أجهزة الترشيح المستخدمة في مختبرات الأحياء الدقيقة : Seitz Filter ، BerkeField Filter ، Chamberlan Filter .

المختبر الرابع

الأوساط الزرعية **Culture media**

الأوساط (ومفردها الوسط Medium) هي البيئات التي تنمى فيها أو عليها الأحياء الدقيقة لما تحتوي على المتطلبات الغذائية المختلفة للنمو من النيتروجين والكاربون والفسفور والكبريت والعناصر النادرة وغيرها . وتختلف الأوساط المستخدمة لتنمية الأحياء الدقيقة عموماً تقسم إلى مجموعتين رئيستين من حيث التغذية هما : ذاتية التغذية Autotrophs وغير ذاتية التغذية (عضوية التغذية) Hetrotrophs ، والأولى تتمكن من النمو معتمدة على مركبات غير عضوية أما المجموعة الثانية فبإمكانها استغلال المركبات العضوية كمصادر للعناصر المذكورة أعلاه .

والأوساط الزرعية لا توفر للأحياء المجهرية احتياجاتها من العناصر الغذائية فحسب وانما توفر لها أيضاً الظروف الفيزياوية أو العوامل الفيزياوية من النشاط المائي والضغط الازموزي والرقم الهيدروجيني الملائم وكمية الأوكسجين ودرجة الحرارة ، والعامل الأخير يتم التحكم به خارجياً من خلال حضن الأوساط الملقحة أو المزروعة في الحاضنة Incubator .

ولتسهيل دراسة الأوساط الزرعية أو الغذائية كما تسمى أحياناً تقسم هذه الأوساط إلى مجاميع مختلفة اعتماداً على أسس متباينة وكما هو موضح أدناه :

- الحالة الفيزياوية

1 - الأوساط السائلة Liquid Media وهذه تكون خالية من مادة الأكَار Agar (لاحظ تعريف وأهمية هذه المادة في الفقرات اللاحقة) لذلك تبقى سائلة بعد تحضيرها وتعقيمها . وتنتهي تسمية الأوساط الجاهزة من هذا النوع اما بكلمة <u>Broth</u> أو <u>medium</u> .

مثال : Nutrient Broth – Mac Conky Broth – Litmus milk medium .

2 - الأوساط شبه الصلبة Semi – Solid Medium

وهذه تحتوي على نسبة من الأكَار في حدود 1% وتتخذ الأوساط شبه الصلبة بعد تحضيرها وتعقيمها قواماً أقل صلابة من قوام الهلام وتستخدم في أغراض خاصة كفحص الحركة مثل : Semi – Solid motility Medium

3 - الأوساط الصلبة Solid Media

وهذه تحتوي على 1.5-2% من مادة الأكَار التي تجعل قوام الوسط هلامياً (شبه الجلي) وتنتهي تسمية الأوساط الجاهزة من هذا النوع بكلمة Agar للدلالة على احتواء الوسط على مادة تساعد على تصلبها بعد التحضير ومن الأمثلة عليها :

MacConky Agar – Nutrient Agar وغيرها

الأكَار Agar :

مادة تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء لاسيما تلك الأنواع التي تعود لجنس *Gelidium* ، إذ تشكل هذه المادة أحد مكونات الجدران الخلوية في الأنواع التابعة لهذا الجنس . والأكَار مركب كاربوهيدراتي معقد يشكل الكالكتوز Galactose الوحدات الأساسية فيه .

يستخدم بنسبة 1.5-2% في الأوساط الغذائية كعامل مساعد في تصلب هذه الأوساط واتخاذها قواماً هلامياً يشبه قوام الجلي ، تتميز مادة الأكَار بالسمات المذكورة أدناه والتي أهلتها في ان تحتل المقدمة ضمن قائمة من المواد التي تستخدم للغرض نفسه :

1- انها تذوب في حدود درجة غليان الماء ، وتتصلب عند تبريدها إلى 42°م.

2- تساعد مقادير قليلة منها في تصلب كميات كبيرة من الأوساط إذ يكفي 1.5-2 % غرام منها لتصلب 100 ملليلتر من الوسط .

3- مادة الأكار من المواد التي لا تهاجم أو تحلل من قبل معظم الأحياء الدقيقة وهذا يعني ضمناً انها لا تستهلك في الوسط الزرعي كمادة مغذية من قبل الأحياء التي يتم تنميتها في هذه الأوساط.

ويذكر ان الجيلاتين (وهو مادة بروتينية) يستخدم في تصلب الأوساط قبل الشروع باستخدام مادة الأكَار . بيد ان الجلاتين تهاجم وتستهلك من قبل الأحياء الدقيقة وان الجلاتين لا يتصلب الا عند خفض درجة حرارية إلى 25م° أو دون ذلك مما يحول دون امكانية استخدامه في الأوساط المستخدمة لتنمية الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة Thermophilic ويتطلب تصلب 100 ملليلتر من الوسط حوالي 20 غرام من الجلاتين ، من هنا كان البحث مستمراً عن مادة بديلة عن الجلاتين يمكن استخدامها لتصلب الأوساط الغذائية وجاء المقترح باستخدام مادة الأكَار من قبل زوجة احد مساعدي كوخ المولودة في تيوجرسي ، إذ كانت هذه المادة تستخدم في صناعة بعض الأطعمة التي كانت تتخذ قواماً جيلاتينياً بعد التبريد في بعض الدول الأفريقية .

- الغرض من الاستخدام

تقسم الأوساط الغذائية أو الزرعية حسب الأغراض التي تستخدم من اجلها إلى الأنواع الآتية:

1- أوساط عادية Ordinary

وهذه تصلح لتنمية معظم وليس جميع الأحياء الدقيقة مثل : Nutrient Agar .

2- أوساط غنية Enriched Media

وهذه الأوساط تدعم ببعض المكونات والمواد التي تشجع نمو الأحياء الدقيقة الشرهة Fastidious أي التي تحتاج إلى العديد من عوامل النمو ومن الأمثلة على هذه الأوساط:

Brain heart infusion Broth – Blood Agar

3- أوساط تفريقية Differential Media

وفيها تنمو أكثر من نوع واحد غير ان أحد هذه الأنواع تكون مميزة يمكن تفريقها عن الأنواع الأخرى من حيث اللون وشكل المستعمرات مثل :

MacConky Agar– Eosine Methylene Blue Agar (EMB–Agar)

وقد تسمى مثل هذه الأوساط بـIndicator Media إذ أنها تحتوي على دلائل أو كواشف الرقم الهيدروجيني الذي يتغير لونها بتغير الرقم الهيدروجيني بفعل تخمر أنواع معينة من السكريات في الوسط . فالوسطان المذكوران أعلاه يمكن استخدامهما لتمييز بكتريا *Escherichia coli* تمييزاً أولياً مباشراً في عينة من العينات كالماء أو الحليب مثلاً فالوسط MacConky Agar يحتوي على صبغة Nutral red التي يتغير لونه من الأصفر الشاحب إلى الأحمر القاني بتغير PH الوسط نتيجة استهلاك سكر اللاكتوز (مصدر الكاربون الوحيد في الوسط) بوساطة بكتريا القولون الوحيدة القادرة على استهلاك هذا السكر بين البكتريا السالبة .

ويذكر ان الوسط يحتوي على أملاح الصفراء Bile Salt المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كَرام ، لذلك فان بكتريا القولون تتميز على هذا الوسط بتكوينها مستعمرات حمراء .

4- الأوساط الانتقائية Selective Media

وهذه تحتوي على مواد تنبط نمو أنواع معينة أو مجاميع معينة وتشجع نمو نوع أو مجموعة من البكتريا ومن هذه المواد : آزايد الصوديوم ويضاف إلى وسط عزل بكتريا Lactic Acid ذلك لأن هذه المادة تؤثر في البكتريا الحاوية على Cytochrom Oxidas وبكتريا حامض اللاكتيك خالية من هذا الانزيم فلا تؤثر عليه .

كما تستخدم صبغة Gystal Violet في بعض الأوساط لجعلها أكثر انتقائية للبكتريا السالبة لصبغة كَرام ، وكذلك الحال بالنسبة لأملاح الصفراء والمضادات الحيوية وغيرها مثل :

(*Salmonella* لعزل بكتريا) Brilliant green Agar

5- أوساط الاختبار Assay Media

وهذه تستخدم لقياس كمية المضادات الحيوية أو الفيتامينات المنتجة من قبل الأحياء الدقيقة . ومن حيث التصنيف أعلاه يمكن وضع وسط غذائي معين في أكثر من موضع واحد .

- المكونات الكيمياوية

1 - أوساط معروفة التركيب كيمياوياً Chemically defined Media

ويمكن تسميتها بالأوساط الاصطناعية Synthetic Media وهي الأوساط التي تحتوي أو تتألف من مركبات كيمياوية معروفة التركيب مثل :

Glucose inorganic salt media ويتكون من المكونات الآتية :

المكونات	غم/لتر من الوسط
الكلوكوز	5
K_2HPo_4	7
KH_2Po_4	2
$MgSo_4$	0.08
$(NH_4)_2So_4$	1
الماء	1000 مل

- يتم تعقيم الكلوكوز عادة بصورة منفصلة عن الأملاح نظراً لان تسخين الكلوكوز مع الأملاح يؤدي إلى تكون مركبات سامة لنمو البكتريا .
- يمكن تحويل هذا الوسط السائل أو أي وسط سائل إلى صلب بإضافة الأكَار إليه بنسبة 1.5-2 % .
- يستخدم الوسط أعلاه لتنمية بكتريا *E.coli* ، وهناك العديد من الأوساط التركيبية الأخرى لتنمية الأنواع الأخرى من البكتريا بما في ذلك البكتريا ذاتية التغذية Autotrophs ، بل ان الأوساط الاصطناعية غالباً ما تستخدم لتنمية البكتريا أو الأحياء ذاتية التغذية شريطة ان تكون خالية من مصدر الكاربون (الكلوكوز) .

2 - الأوساط غير الاصطناعية Non synthetic media

ويمكن تسميتها بالأوساط الطبيعية Natural media وهذه تتكون من مواد طبيعية أو مشتقاتها أو أجزاء منها كالحليب واللحم والبيض وبعض الأنسجة النباتية والتي تحتوي على الاحتياجات الغذائية المطلوبة للأحياء المراد تنميتها على شكل مركبات عضوية معقدة ، ومن الأمثلة عليها : Nutrient Broth ويتألف من المكونات الآتية :

المكونات	غم/لتر
بپتون Peptone	5
مستخلص اللحم Meat extract	3
ماء	1000 مل

وفي أدناه جدولاً يتضمن مواصفات بعض المواد المستعملة في تحضير الأوساط الزرعية الطبيعية أو الاصطناعية :

مستخلص أو خلاصة اللحم Meat extract	مستخلص مائي للحم المركز بشكل عجينة	يحتوي على المواد الذائبة في المواد الموجودة في أنسجة الحيوانات كالكربوهيدرات ومركبات نيتروجينية عضوية والفيتامينات والأملاح وغيرها
بپتون Peptone	مادة ناتجة من هضم المواد البروتينية كاللحوم والكازين أو البروتينات النباتية هضماً انزيمياً	يحتوي على ببتيدات ذات حجوم مختلفة تستخدم مصدراً للنيتروجين العضوي من قبل الأحياء الدقيقة وقد تحتوي أحياناً على بعض الفيتامينات والكربوهيدرات اعتماداً على المصدر الذي تحضر منه .
مستخلص الخميرة Yeast extract	مستخلص مائي لخلايا الخميرة	مصدر غني بالفيتامينات والأملاح ويعد أيضاً مصدراً للنيتروجين العضوي والكربوهيدرات

- ويذكر ان هناك شركات متخصصة لتحضير الأوساط الزرعية او الغذائية مثل شركة oxoid ، Difco ، Fluca وغيرها . يتم تجهيز هذه الأوساط من قبل الشركات على صورة مسحوق ذو لون بني فاتح في الغالب وفي عبوات تكون معلمة تتضمن المعلومات الآتية :

اسم الوسط ، نوع الوسط ، الأغراض التي تستخدم من أجلها (عزل Isolation – عد enumeration – تشخيص Identification – تمييز Differentiation) ، مكونات الوسط ، طريقة تحضير الوسط .

الجزء العملي :

- أولاً : الاطلاع على عدد من الأوساط المجهزة من قبل الشركات المجهزة وهي :

- Nutrient Broth
- Nutrient Agar
- MacConky Agar
- EMB Agar
- Potato Dextrose Agar (PDA)
- Manitol Salt Agar

وتسجل المعلومات الأساسية عن هذه الأوساط

- ثانياً : تحضر 500 مل من وسط Nutrient Agar ويتم تحضير باتباع الخطوات الآتية :
- يتم وزن كمية من حسب تعليمات الشركة ، فإذا كانت تعليمات الشركة تشير مثلاً : إلى إذابة 28 غرام من الوسط في لتر واحد (لتحضير لتر من الوسط) يتم عندئذ وزن 28 غرام منه اذا كان المطلوب تحضير لتر من الوسط .
- تذاب الكمية الموزونة من الوسط في الكمية المطلوبة من الماء المقطر إذابة تامة (وباستخدام اللهب) في دورق مخروطي .
- ينقل الدورق المخروطي بعد تغطيته (اما بغطائة البلاستيكي أو بالقطن) إلى جهاز التعقيم البخاري Autoclave لتعقيم الوسط في 121°م لمدة 15 دقيقة (أو أية درجة حرارة ووقت يحددها المجهز) وقد تعتمد طريقة أخرى للتعقيم اعتماداً على توجيهات المجهز أيضاً أو طبيعة الوسط .
- يبرد الوسط بعد تعقيمه إلى 50-55°م ثم يوضع في أطباق بتري Petridish معقمة سابقاً ونترك الأطباق على سطح مستو لحين تصلب الوسط (اذا كان الوسط حاوياً على مادة الأكَار) وبهذا يصبح الوسط جاهزاً للاستخدام .

ملاحظة : يتم توزيع الوسط في أنابيب الاختبار وذلك قبل التعقيم اذا كان من الأوساط السائلة :

- ثالثاً : اختبار أو اثبات وجود الأحياء الدقيقة في كل مكان من الطبيعة
- بعد تحضير الوسط Nutrient Agar باتباع الخطوات المذكورة أعلاه وصبه في أطباق بتري . تنقل عينات مختلفة إلى كل طبق من هذه الأطباق وتغلق فوراً .
- تحضن الأطباق في 37°م (في الحاضنة Incubator) مدة 24-48 ساعة .
- تسجل الملاحظات الخاصة عن المستعمرات النامية في الاطباق من حيث الشكل والعدد .

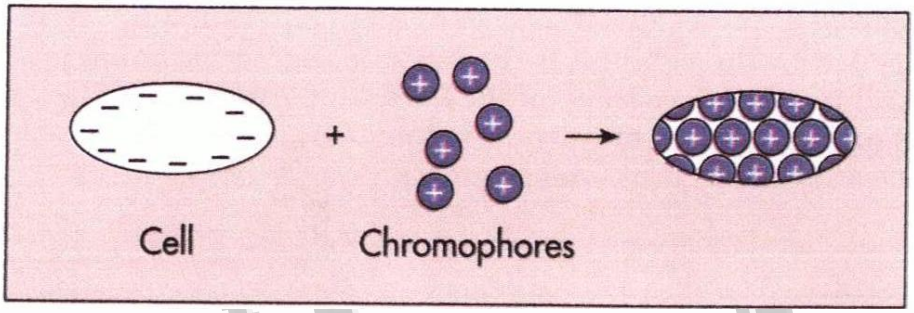
المستعمرة Colony : وتدعى بقع النموات الحاصلة على سطح الأوساط الصلبة في أطباق بتري Petri بالمستعمرات والتي تختلف من حيث الحجم والشكل واللون باختلاف البكتريا التي تكونها ، وكل مستعمرة تنشأ من خلية واحدة من خلال تكاثرها تكاثراً ثنائياً بسيطاً فتكون مجموعة من خلايا من أصل واحد ... مجتمعة في موقع واحد من الوسط تظهر على نحو بقعة من النمو تمييزها بالعين المجردة.

المختبر اخامس

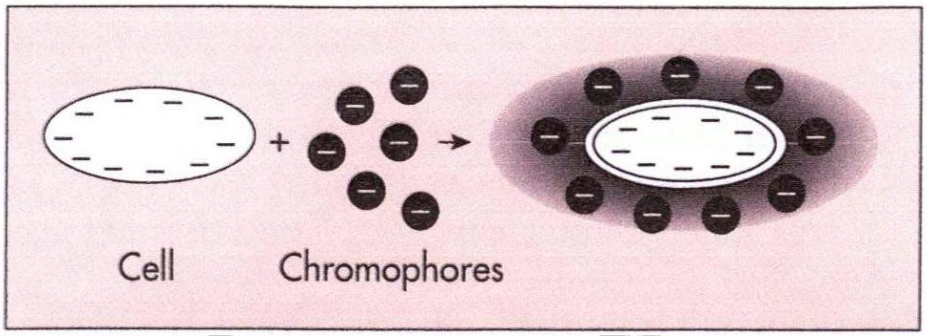
تصبيغ البكتريا Bacterial staining

تمتاز الأحياء الدقيقة بشفافيتها العالية وهذا يعني أنها تسمح بمرور الضوء من خلالها بكثافة عالية تقارب كثافة الضوء المار من خلال الشريحة الزجاجية تقريباً ، عليه فأن رؤيتها تحت المجهر وهي بحالتها الاعتيادية غير المصبوغة لا تكون واضحة أي انها لا تميز كثيراً من الشريحة الزجاجية من هنا يتم تصبيغ Staining خلايا الأحياء الدقيقة ولاسيما البكتريا ، بكلمة أخرى ان الغرض الأساس من التصبيغ هو جعل خلايا البكتريا قابلة لرؤيا تحت المجهر على نحو مميز . هذا أولاً ، كما ان التصبيغ يساعد في تمييز الأشكال الخارجية للبكتريا وتمييز بعض أجزائها كالسبورات (Spores) والكبسولة (Capsule) .

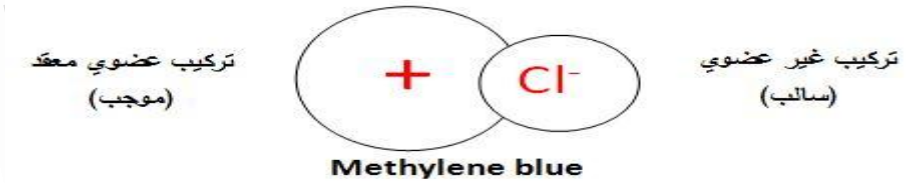
والصبغات (dyes) هي مواد كيمياوية مؤلفة من جزئيين أحدهما عضوي وهو المسؤول عن التصبيغ (أي منح خلايا البكتريا لون الصبغة) ويسمى بـChromophore والجزء الثاني غير عضوي مكمل قد يكون أيوناً سالباً أو موجباً مثل صبغة المثيلين الأزرق الذي يتألف من جزء عضوي موجب وجزء غير عضوي هو أيون الكلور السالب. كما في الشكل (3) ،(4) ،(5).



شكل (3): ارتباط الجزء المسؤول عن التصبيغ Chromophore والحامل للشحنات الموجبة مع الخلية البكتيرية



شكل (4): تنافر الشحنة السالبة للجزء المسؤول عن التصبيغ فيها والحامل للشحنات السالبة مع الشحنة السالبة للبكتريا



شكل (5): تركيب الصبغات dyes

وتقسم الصبغات على أساس الشحنات التي تحملها الأجزاء العضوية المسؤولة عن التصبيغ أي من الناحية الكيمياوية إلى :

1 - الصبغات القاعدية Basic Dyes مثل :

Metlylene Blue	لون الصبغة أزرق
Malachite green	لون الصبغة أخضر
Safranine	لون الصبغة أحمر أو وردي
Crystal violet	لون الصبغة بنفسجي

ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنة موجبة أما الجزء اللاعضوي فيكون سالباً .

2 - الصبغات الحامضية Acidic dyes مثل : Acidic Fuchsin , Nigrosine ويكون الجزء العضوي في هذه الصبغات حاملاً لشحنات سالبة والجزء اللاعضوي المكمل يكون موجباً . وهذه الصبغات تسمى أحياناً بالسالبة Negative .

وهناك تقسيمات آخر للصبغات على أساس الغرض من استخدامها أي الغرض من عملية التصبيغ :

1. التصبيغ البسيط simple staining
وفيه يستخدم صبغة واحدة في جميع مراحل التصبيغ مثل Methylene Blue .

2. الصبغات التفريقية Differential Stain مثل :
Acid – fast stain – Giemsa stain – Gram's stain وفيها تستخدم أكثر من صبغة واحدة خلال مراحل التصبيغ . وبالنتيجة تكتسب خلايا البكتريا لون صبغة واحدة من هذه الصبغات وليس جميع الصبغات المستخدمة . وتفيد الصبغات في تمييز البكتريا إلى مجموعتين او أكثر اعتماداً على لون الصبغة المكتسبة .

3. الصبغات السالبة Negative stain
ويقصد بها الصبغات الحامضية وهذه لا تصبغ البكتريا نفسها وانما محيط البكتريا تاركة البكتريا تبدو شفافة تحت المجهر .

4. الصبغات المتخصصة Special stain
وهذه الصبغات تستخدم لتصبيغ أجزاء معينة من البكتريا كالسبورات Spore stain والكبسولة Capsule والأسواط Flagella stain دون أجزاء الخلية الأخرى .

الفكرة الأساسية في التصبيغ البسيط :

يمكن اعتبار خلية البكتريا انها تسلك سلوكاً حامضياً سالباً لاحتوائها على الكثير من المركبات الحاملة للشحنات السالبة وعند إضافة الصبغة إليها (ولاسيما الصبغات القاعدية) فأن الجزء المسؤول عن التصبيغ الحامل لشحنات موجبة تبادل شحناتها مع البكتريا كما هو موضح في المعادلة التشبيهية الآتية :

$$\mathbf{(Bact)^{-}\,Na^{+} + (Mb)^{+}\,Cl^{-} \rightarrow (Mb)^{+}\,(Bact)^{-} + Nacl}$$

خطوات التصبيغ البسيط :

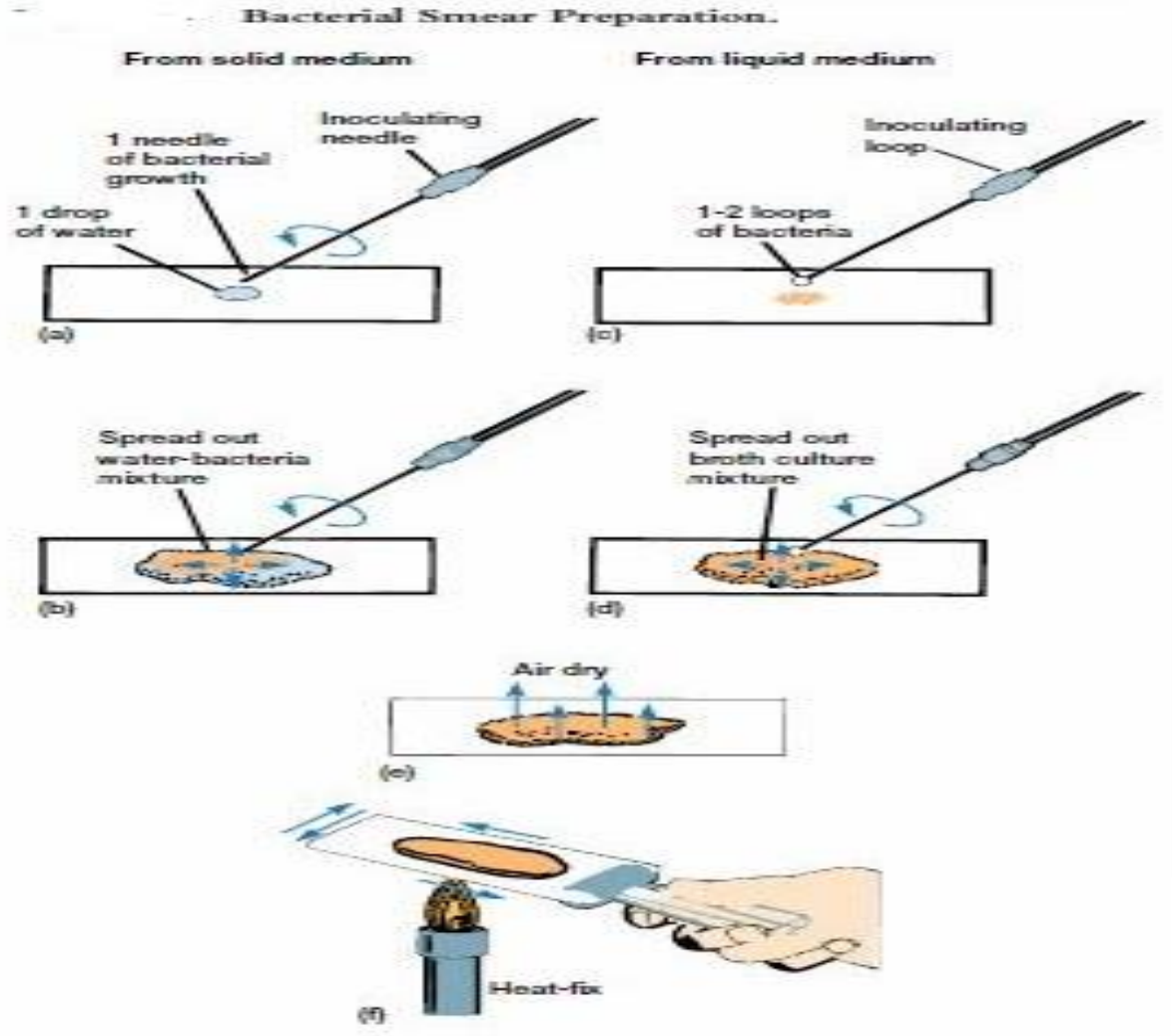
تسبق عملية التصبيغ خطوة مهمة وأساسية هي خطوة تحضير العشاء Smear والتي تستهدف تثبيت خلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية والتصاقها بها لمنع إزالتها أو ازاحتها في خطوات التصبيغ التي يتخللها الغسل بالماء لإزالة الصبغة الزائدة .

تحضير الغشاء Smear

1 - تؤخذ شريحة زجاجية نظيفة وتوضع فوقها قطرة ماء بوساطة Loop .
2 - تسحب مسحة من النمو البكتيري من مزرعة البكتريا ويمزج جيداً مع قطرة الماء على الشريحة مع نشرها بوساطة Loop على مساحة 1سم2 دائري واحد .
3 -يجفف مزيج البكتريا وقطرة الماء على الشريحة تجفيفاً هوائياً أو بإمرار الشريحة على اللهب ، وبذلك يتحقق التصاق الخلايا بالشريحة .

خطوات التصبيغ

1 -توضع قطرة من الصبغة المطلوبة (صبغة المثيلين الأزرق) على الغشاء المحضر وتترك لمدة 2-3 دقائق .
2 -تغسل الصبغة الزائدة بأمرار ماء حنفية جاري بسرعة متوسطة على الغشاء المصبوغ .
3 -تجفف الشريحة هوائياً أو باللهب ثم تفحص الخلايا تحت المجهر على القوة الصغرى أولاً ثم تحت العدسة الزيتية .



المختبر السادس

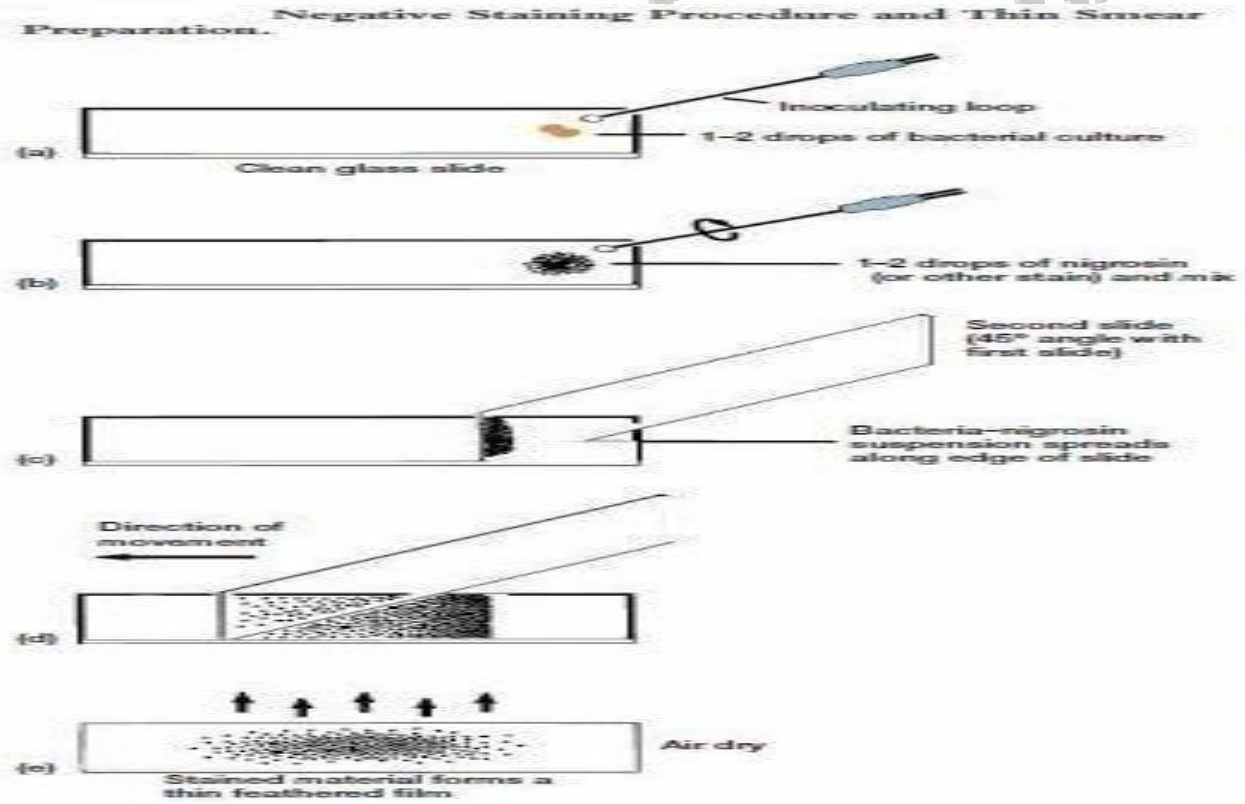
Negative staining التصبيغ السالب

يهدف هذا النوع من التصبيغ إلى التعرف على الشكل الموروفورلوجي للبكتريا حيث يستخدم فيه صبغات حامضية أي التي تتنافر مع خلايا البكتريا ذات الطبيعة الحامضية أيضاً ، فيحدث ان الصبغة لا تدخل إلى داخل الخلية البكتيرية ولا تتصبغ بها فتبقى الصبغة خارج الخلية وتعمل على تلوين محيط الخلية بلون الصبغة المستخدمة .

وتتم عملية التصبيغ باتباع الخطوات الآتية :

1 - توضع قطرات من صبغة النيكروسين Nigrosin قريباً من احدى نهايتي الشريحة .
2 - تؤخذ مسحة من النمو البكتيري من المزرعة وبوساطة Loop تمزج مع الصبغة على الشريحة .
3 - يتم نشر مزيج النمو البكتيري والصبغة على طول الشريحة بأمرار حافة الشريحة ثانية نظيفة ويوزع المزيج على طول الشريحة الاولى. كما في الشكل

طريقة نشر مزيج النمو البكتيري والصبغة



4 - تترك الشريحة إلى ان تجف تماماً ، وتفحص تحت المجهر باستعمال العدسة الصغرى ثم الزيتية حيث تلاحظ الخلايا شفافة (غير مصبوغة) في محيط أسود مصبوغ بلون صبغة النيكروسين الأسود .

ملاحظة : ليس هناك معاملة حرارة أو تثبيت البكتريا على الشريحة بطريقة تحضير الغشاء في هذه الطريقة وفي هذا تختلف هذه الطريقة عن طريق التصبيغ الأخرى.

المختبر السابع

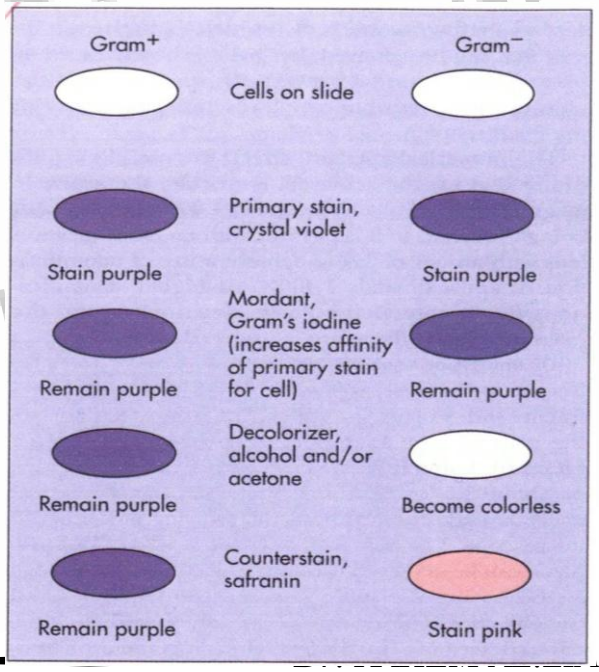
تصبيغ البكتريا (صبغة كَرام) Grams Stain

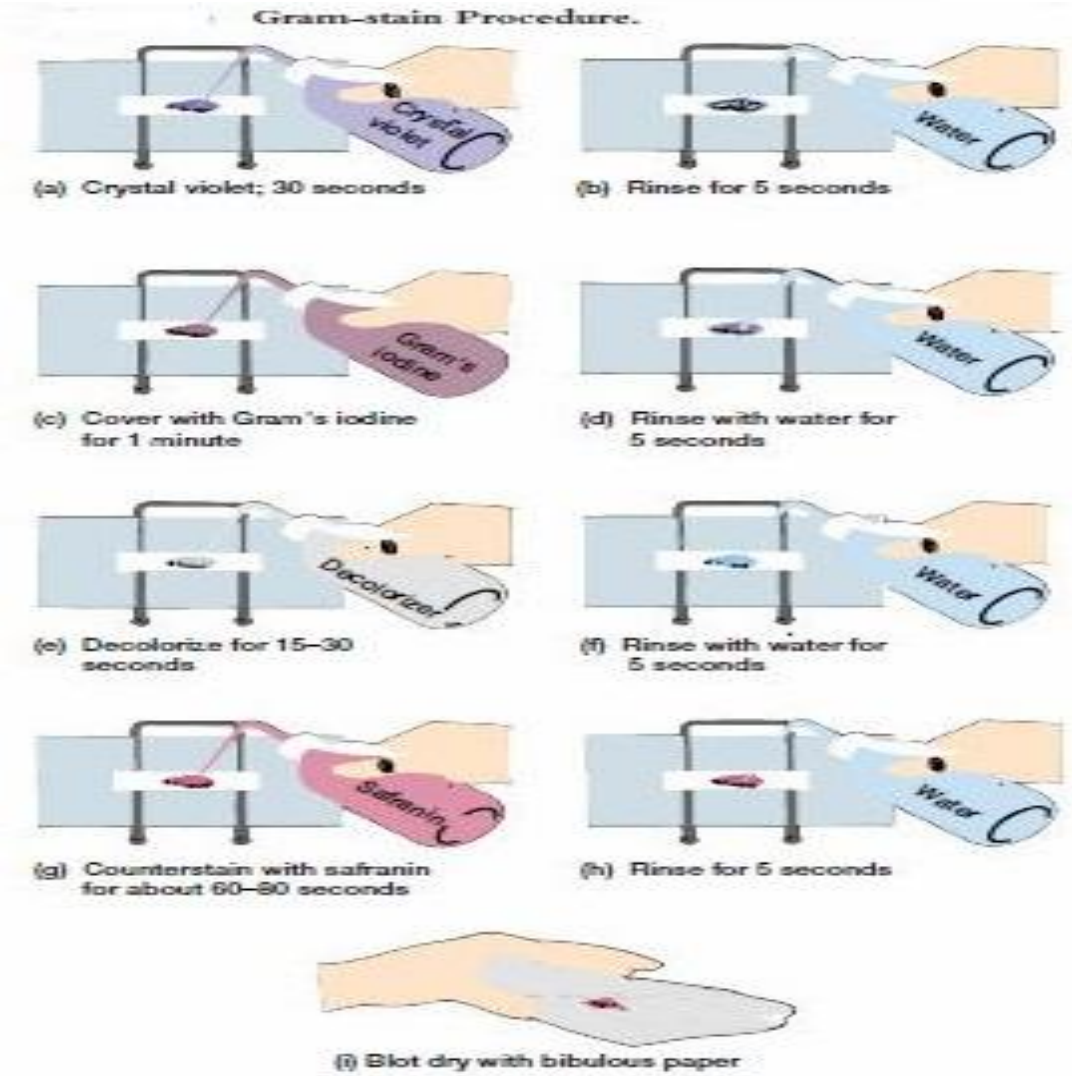
كما سبق معنا في الدرس السابق ان هناك صبغات معينة تستخدم لتصبيغ البكتريا بهدف التشخيص وتحديد المواقع التصنيفية لها ومن هذه الصبغات صبغة كَرام . وسميت صبغة كَرام بهذه التسمية نسبة إلى مكتشفها الطبيب الدنماركي Dr.Hans Christian عام 1883 وتتكون صبغة كَرام من الصبغات والمواد الآتية وحسب تسلسل استخدامها في عملية التصبيغ :

1. Crystal violet بنفسجي
2. Iodine Solution (Gram's Iodin)
3. Ethanol %95
4. Safranin (counter stain)

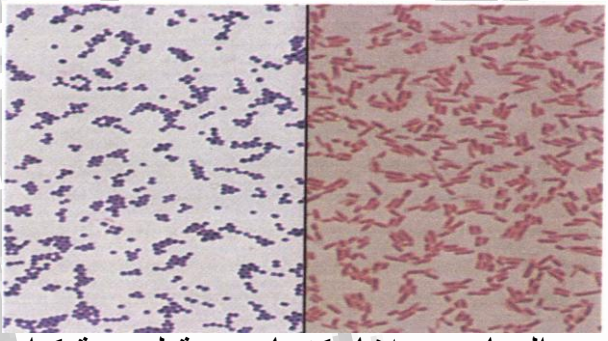
تتلخص خطوات التصبيغ بما يأتي :-

1 - بعد تحضير الغشاء من البكتريا المراد تصبيغها تضاف قطرات من صبغة الكريستال البنفسجي وتترك بحيث تلامس الغشاء لفترة دقيقة واحدة .
2 - تغسل الصبغة الزائدة بالماء .
3 - تضاف قطرات محلول اليود على الغشاء وتترك لدقيقة واحدة .
4 - تغسل الصبغة الزائدة بالماء .
5 - تضاف قطرات من الكحول الأثيلي (بتركيز 95%) وتترك ملامسة للغشاء فترة $\frac{1}{2}$ دقيقة.
6 - يغسل الكحول الزائد بالماء .
7 - تضاف قطرات من صبغة Safranin على الغشاء وتترك لمدة $\frac{1}{2}$ دقيقة ثم تغسل بالماء .
8 - تجفف الشريحة وتفحص بالعدسة الصغرى ثم العدسة الزيتية ، حيث نلاحظ ان البكتريا قيد الفحص أما اكتسبت لون الصبغة الأولى وهي صبغة الكريستال البنفسجي فيظهر عندئذ تحت المجهر اللون البنفسجي وتسمى البكتريا في هذه الحالة ببكتريا موجبة لصبغة كَرام ويرمز لها بـG^+ أو g^+ . او أنها تظهر تحت المجهر بلون الصبغة الأخيرة وهي صبغة السفرانين الوردي وتسمى البكتريا في حالة ظهورها باللون الوردي (أو الأحمر) ببكتريا سالبة لصبغة كَرام ويرمز لها بـG^- أو g^-. كما في الشكل (7) ،(8).





شكل (7): خطوات تصبيغ كرام Gram Staining



شكل (8): من اليسار : خلايا بكتريا موجبة لصبغة كرام (**بنفسجية**)

من اليمين : خلايا بكتريا سالبة لصبغة كرام (**وردية**)

ان صفة الاحتفاظ باللون الوردي أو باللون البنفسجي صفة خاصة بالبكتريا على مستوى الجنس ولا تحيد عن هذه الصفة البكتريا الا في حالات نادرة كان تكون المزرعة البكتيرية قديمة جداً .

من الأمثلة على البكتريا السالبة لصبغة كَرام (g^-) والتي تظهر دائماً (وليس بين فترة وأخرى) باللون الوردي بعد الانتهاء من تصبيغها بصبغة كَرام :

Salmonella typhi *Escherichia Coli*
Shigella dysamteria *Enterobacter aerogenes*

وجميع البكتريا المصنفة ضمن عائلة *Enterobacteraceae*

ومن الأمثلة على البكتريا الموجبة لصبغة كرام (g^+) والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي:

Lactobacillus spp. *Clostridium spp.*
Streptococcus *Bacillus spp.*

واذا ما جرت عملية التصبيغ على مراحل وتم فحص الخلية البكتيرية في كل مرحلة تحت المجهر فأنها تلاحظ كالآتي :

مراحل التصبيغ	لون البكتريا تحت المجهر	
	بكتريا g+	بكتريا g-
1- الكريستال البنفسجي	بنفسجي	بنفسجي
2- محلول اليود	بنفسجي	بنفسجي
3- الكحول الأثيلي	بنفسجي	عديم اللون
4- السفرانين	بنفسجي	أحمر – وردي
المرحلة الأخيرة	بنفسجي	وردي

النظريات التي تفسر تصبيغ خلايا البكتريا بصبغة كَرام

ان احتفاظ خلايا بعض أنواع البكتريا بصبغة الكريستال البنفسجي وظهورها تحت المجهر باللون البنفسجي واحتفاظ البعض الآخر بصبغة السفرانين وظهورها تحت المجهر باللون الأحمر يعود هذا الاختلاف إلى التباين في التركيب الكيمياوي لجدار الخلية بين هذين النوعين من البكتريا . فجدار خلايا كرام السالبة من البكتريا يحتوي على نسبة عالية من المواد الدهنية التي يزال جزء منها بإضافة الكحول في المرحلة الثالثة من عملية التصبيغ الأمر الذي يؤدي إلى نضوح معقد صبغة الكريستال – اليود من الخلية إلى الخارج فتكون الخلية مهيئة لاستقبال صبغة أخرى وهي صبغة السفرانين عليه تبدو هذه الأنواع من البكتريا باللون الوردي عند الانتهاء من تصبيغها بصبغة كرام . بخلاف البكتريا الموجبة لصبغة ركام والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي حيث تحتوي جدارها الخلوي على نسبة واطئة (في حدود 2%) من المواد الدهنية.

وهناك نظرية أخرى تفسر احتفاظ خلايا كرام الموجبة بلون صبغة الكريستال البنفسجي وهي ان خلايا هذه البكتريا تحتوي نسبة عالية من أيونات المغنسيوم Mg^{++} التي تساعد في ارتباط معقد الصبغة واليود بمكونات الخلية ذات السلوك الحامضي .

C.V – I – Mg – RNA – protein

ويحول المعقد دون ترك الصبغة للخلية حتى في حالة معاملتها بالكحول . ويوضح الجدول أدناه بعض الفروقات بين بكتريا g^+ و g^- :

الخواص	g^+	g^-
– الحساسية تجاه المضادات الحيوية وبخاصة البنسلين	كثير الحساسية	قليل الحساسية
– محتوى الجدار الخلوي من المواد الدهنية .	قليلة (2-3%)	كثيرة (20-30%)
– الميزوزومات Mesosomes	موجودة	غير موجودة أو نادرة
– أنزيم Lysozyme	يؤثر	لا يؤثر

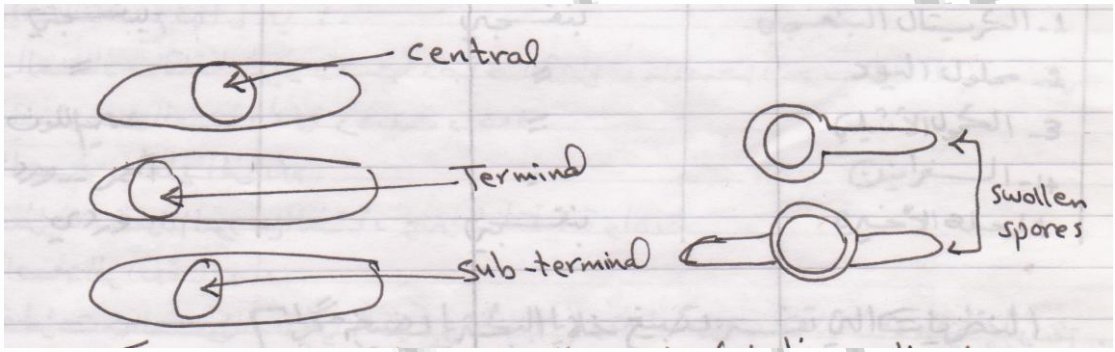
المختبر الثامن

تصبيغ السبورات الداخلية Endospores Staining

الأبواغ أو السبورات عبارة عن تراكيب تنشأ داخل البكتريا ولاسيما تلك التابعة لمجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام . والبوغ نمط خلوي استثنائي يتكون ضمن الخلية الخضرية عند نموها تحت ظروف غذائية أدنى من الظروف المثالية وهذه التراكيب تستطيع مقاومة الظروف الخارجية المتطرفة كالحرارة العالية والجفاف وقد ثبت وجود بعض السبورات تعود تاريخها إلى الاف السنين .

وتحتوي الأبواغ على حامض Dipicolinic acid ونسبة عالية من أملاح الكالسيوم وهذان المركبان مسؤولان عن مقاومة السبورات الشديدة للظروف الخارجية القاسية .

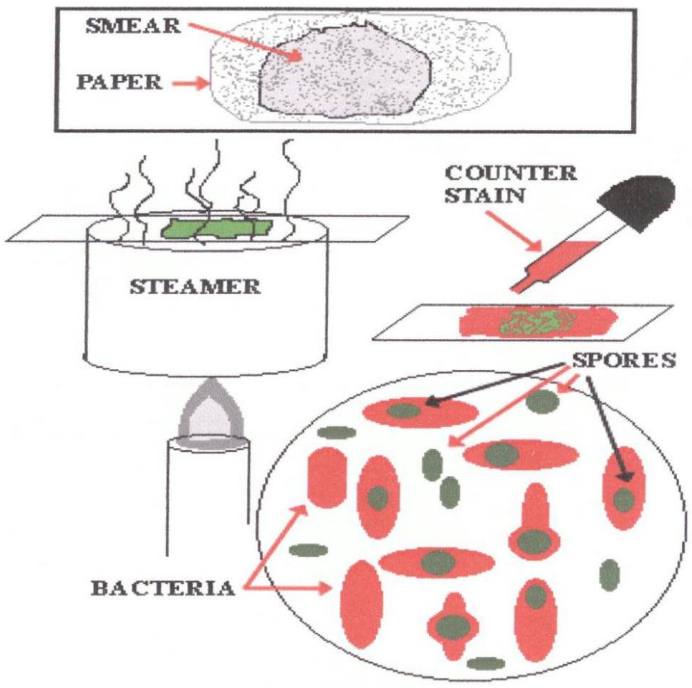
ويختلف موقع الأبواغ من بكتريا إلى أخرى فقد يكون موقعها طرفياً Terminal أو مركزياً Central أو تحت طرفية Sub – terminal وقد يكون البوغ منتجاً Swollen Spore. كما في الشكل (9).



شكل (9): مواقع الابواغ في أنواع من البكتريا

– والملاحظ ان معظم البكتريا بل ان الغالبية العظمى منها القادرة على تكوين السبورات هي موجبة لصبغة كرام .
– وتعود البكتريا المكونة للسبورات اما إلى جنس *Bascillus* (وهي هوائية) أو لا هوائية مثل *Clostridium* وكلاهما بكتريا عضوية موجبة لصبغة كرام .

والسبورات لا تصبغ بالصبغات العادية البسيطة والخارجية وانما بصبغات خاصة وبطريقة معينة . وهناك طرائق عديدة لتصبيغ السبورات ومن ابسطها الطريقة الآتية كما في الشكل (10):



شكل (10): خطوات تصبيغ السبور باستعمال الصبغة القاعدية

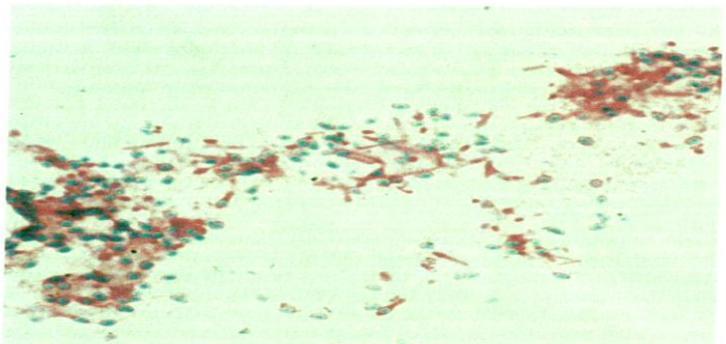
1 - يحضر غشاء Smear من البكتريا المكونة للسبورات .

2 - توضع قطرات من صبغة الملاكايت الخضر Malachite greens بحيث تغطي الغشاء وتعرض الشريحة إلى حرارة اللهب مباشرة بملقط الشرائح أو بتعرضها إلى بخار ماء مغلي في بيكر أو وعاء زجاجي ولمدة 5 دقائق مع متابعة إضافة الصبغة في حالة تبخرها لمنع جفافها .

3 - تبرد الشريحة ثم تترك الصبغة الزائدة بالغسل بالماء .

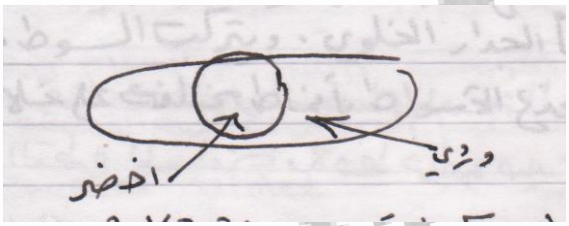
4 - تضاف قطرات من صبغة السفرانين على الغشاء وتترك لمدة $\frac{1}{2}$ - 1 دقيقة ثم تزال الصبغة الزائدة بالماء .

5 - تجفف الشريحة وتفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الصغرى أولاً ثم العدسة الزيتية حيث يلاحظ تلون السبور باللون الأخضر في وسط الخلية وتكون الأجزاء الخضرية باللون الوردي. كما في الشكل (11).



شكل (11): شكل يوضح سبورات البكتريا تحت المجهر مصبغة بصبغة الملاكايت الأخضر في حين تبدو الخلايا الخضرية للبكتريا باللون الوردي

ومما يجب التأكيد عليه ان جفاف صبغة الملاكايت الخضراء أو الحرارة العالية جداً سوف تؤدي إلى تحلل الخلايا. أنظر الشكل (12).



شكل (12): تلون السبور باللون الأخضر، والاجزاء الخضرية باللون الوردي.

ان سبورات البكتريا التي تسمى Endospore لا تعد وسيلة تكاثر وذلك لأن كل خلية تكون سبوراً واحداً وانما هي اي السبورات وسيلة لحفظ النوع .

ملاحظات على تصبيغ السبورات

- ان البكتريا العصوية هي التركيبة القادرة على تكوين السبورات وهذا لا يعني ان جميع البكتريا العصوية تمتلك القدرة على تكوين السبورات .
- السبورات تراكيب كروية تمتلك أغلفة أو جدران قوية سميكة تحتوي على نسبة عالية من الكالسيوم وحامض Dipicolonic ، لذلك فهي أكثر مقاومة للظروف البيئية المتطرفة من درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ونقص المغذيات في الوسط ، وتمثيل السبور أحد صور الخلية في حالة ساكنة .
- السبورات البكتيرية وسيلة للمحافظة على النوع لأنها تتكون بواقع سبور واحد في كل خلية خضرية .
- الهدف من المعاملة الحرارية عند تصبيغ السبورات لعمل شقوق في أغلفة السبورات لإتاحة المجال لصبغة Malachite green من النفوذ إلى داخل السبور . تبدو السبورات تحت المجهر خضراء اللون أما الجزء الخضري من الخلية فيبدو وردياً .
- من أكثر الأجناس العصوية المكونة للسبورات :

Clostridium لاهوائية

Bacillus هوائية

المختبر التاسع

فحص حركة الأحياء الدقيقة بطريقة القطرة المعلقة Hanging Drop

تتحرك البكتريا بوساطة الأسواط Flagella التي هي تراكيب خيطية رفيعة وطويلة تنشأ من الغشاء السايتوبلازمي مخترقاً الجدار الخلوي . ويتركب السوط كيمياوياً من بروتينات تدعى بـFlagellin وتتوزع الأسواط بأنماط مختلفة على خلايا البكتريا تبعاً للجنس والنوع .

وتهدف الأحياء الدقيقة من خلال حركتها :

- الابتعاد عن المؤثرات الخارجية كالحرارة والضوء .
- البحث عن المواد الغذائية أو الاقتراب من المواضع التي تتوفر فيها ظروف بيئية ملائمة للنمو . والحركة اما انتقالية او موضعية ، الاولى تنشأ أو تنتج عن طريق الأسواط أما الحركة الموضعية والتي تسمى أحياناً بالحركة البراونية Brownian movement الناتجة عن تصادم جزيئات الوسط او البيئة السائلة بالبكتريا . تستخدم طريقة بسيطة في متابعة حركة الأحياء الدقيقة تسمى بطريقة القطرة المعلقة التي تحضر باستخدام شريحة مقعرة Convex slide وغطاء شريحة Cover slip والتي يمكن تلخيصها كالآتي، لاحظ الشكل (13) :

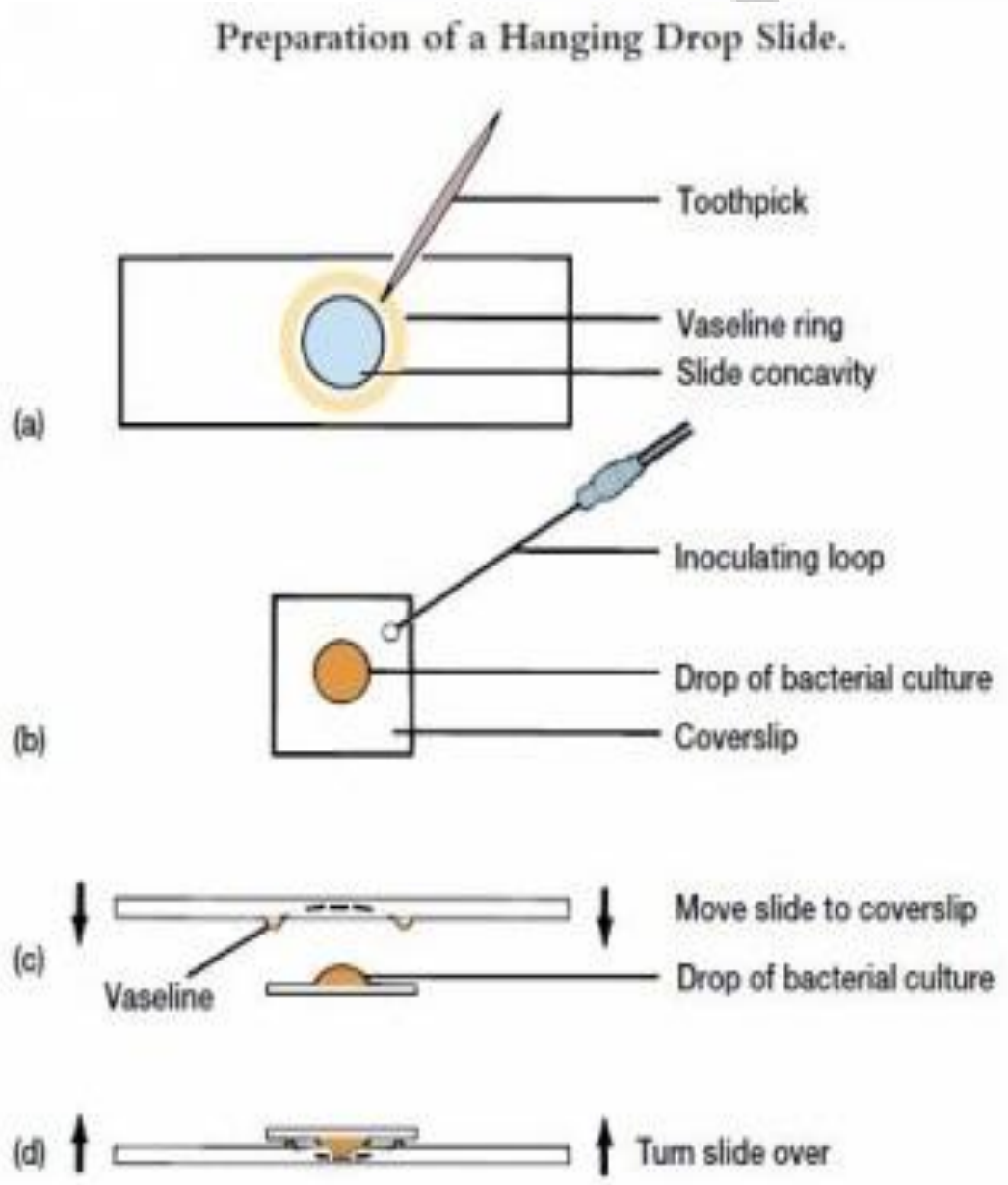
1 - ضع قطرة من المزرعة المختلطة (عينة من ماء راكد أو ملوث) في وسط غطاء الشريحة بوساطة Loop مع مراعاة تعقيمه بعد الاستخدام مباشرة .

2 - بلل حواف غطاء الشريحة من موضعين أو ثلاثة بوساطة قطرة ماء محمولة على Loop وبطريقة الملامسة .

3 -ضع الغطاء على سطح مستو ثم اقلب عليها الشريحة المقعرة بحيث يكون موضع قطرة المزرعة في وسط منطقة التقعر . ان قطرات الماء في حافة الغطاء تساعد على التصاق الغطاء بالشريحة المقعرة بطريقة الشد السطحي.

4 - اقلب الشريحة المقعرة على غطاء الشريحة .

5 - افحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة الصغرى والعدسة الكبرى مسلطاً ضوء العدسة على منطقة القطرة المعلقة ولاحظ حركة الأحياء الدقيقة (الانتقالية الموضعية).



شكل (13): خطوات فحص حركة البكتريا بوساطة القطرة المعلقة **Hanging Drop**

المختبر العاشر

دراسة الصفات المورفولوجية للأعفان

تنتشر الأعفان Molds بصورة واسعة في الطبيعة ويتكون جسم العفن من عدة خيوط والخيط الواحد يحتوي على خلايا عديدة سواء كان مقسم أو غير مقسم يسمى بالخيط الواحد Hypha ومجموعة الخيوط Hyphae والتي تكون ما يسمى بالغزل الفطري Mycelium والذي يقسم اعتماداً على نموه في الوسط الغذائي إلى قسمين :

1 - Sub merged mycelium : تنمو خيوط الهايفات متوغلة في الغذاء .
2 - Aerial mycelium : متفرغة في الهواء أي نامية على سطح الوسط الغذائي .

وتقسم الخيوط الفطرية من الناحية التشريحية إلى قسمين :

1 - Sepetate hyphae : حيث تقسم الخيوط الفطرية بوساطة حواجز عرضية تفصل بين الخلايا وهي ميزة الفطريات الراقية .
2 - Non – Septate hyphae : وهي الهايفات غير المقسمة والتي لا تحتوي على حواجز عرضية وبذلك تكون الخلايا حاوية على انوية منتشرة.

وتقسم الهايفات من الناحية الوظيفية إلى قسمين :

1 - Vegetative hyphae : وهي الخيوط الفطرية الخضرية المسؤولة عن التغذية والتثبيت والامتصاص .
2 - Fertile hyphae : هي الخيوط الفطرية التكاثرية المسؤولة عن التكاثر وتكوين الأجزاء الخضرية او التراكيب الملحقة بها .

تحصل في بعض الحالات تحويرات في الخيوط الفطرية مثل أشباه الجذور Rhizoid في عفن Rhizopus ، والتي تقوم بوظيفة تشبه الجذور لتثبيت العفن في المادة الغذائية وامتصاص المواد الغذائية . ومن التحويرات الأخرى هو الخلية القدمية Foot cell في عفن *Aspergillus* .

تكاثر العفن :

يتكاثر العفن بوساطة تكوين الأبواغ وهي على نوعين جنسية وغير جنسية وتقسم الأخيرة من حيث المنشأ إلى قسمين :

1 -أبواغ داخلية المنشأ :
ويتكون داخل أكياس أو علب تسمى Sporangium وتنشأ داخلها الأبواغ اللاجنسية والتي يطلق عليها عليها Sporangiospore ويطلق على حامل العلبة بـ Sporangiophore ويلاحظ وجود انتفاخ في أعلى الحامل يسمى Columella ولها وظيفة تكاثرية حيث عند نموذج الأبواغ غير الجنسية يندفع هذا الانتفاخ إلى الداخل فيؤدي إلى تشقق العلبة وبالتالي الأبواغ الموجودة داخلها . توجد هذه الأبواغ في الفطريات الواطئة .

2 - أبواغ خارجية المنشأ :
توجد في الفطريات الراقية مثل الفطريات الكيسية *Asscomycetes* ، تتكون هذه الأبواغ التي تسمى كويندیا أو Conidiophore في طرف حامل الكونيديا Conidiophore اذ ينشأ على حامل الـConidia حيث تكون هوائية بهيئة سلسلة وكل واحدة منها تبقى كامنة مدة طويلة وعندما تنبت تكون غزل فطري كما هو الحال في عفن *Penicillium* و *Aspergillus* .

طريقة العمل :

1 - انقل بوساطة Loop جزءاً من العفن المزروع على سطح طبق بتري وضعه في منتصف شريحة زجاجية حاوية على قطرة أو ثلاث قطرات من محلول Lactophenal Blue وضع فوقها غطاء الشريحة Cover slip ثم لاحظ أجزاء العفن بوساطة العدستين الصغرى والكبرى وأرسم جسم وخيوط وأبواغ العفن كما تراه تحت المجهر .

2 - سجل المعلومات التالية :

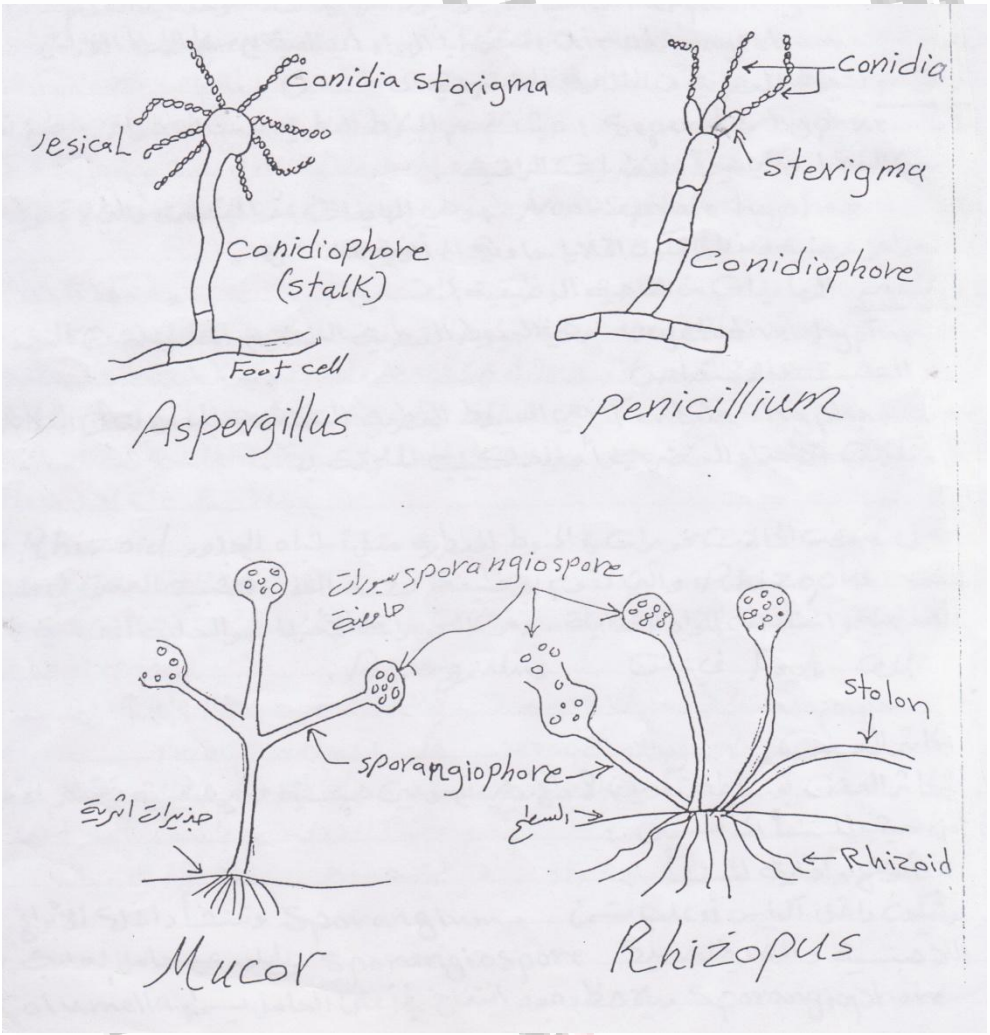
a) جسم العفن mycilium فيما اذا كان مقسماً إلى عدة خلايا أم لا ؟ وفيما اذا كان معتماً أو ملوناً ؟

b) نوع الأبواغ اللاجنسية فيما اذا كانت Conidiospore أو Sporongiospore أو Arthrospores أو Chlamycto Spores .

c) الرؤوس الحاوية على الأبواغ Sporangium .

d) لاحظ أجزاء الاعفان الآتية في الشكل (14) :

Columella , Foot cell , Stolons , Rhizoids



شكل (14): أنواع مختلفة من الأعفان

المختبر الحادي عشر

عد الأحياء الدقيقة بطريقة الأطباق القياسية Standard Plate Count (Spc)

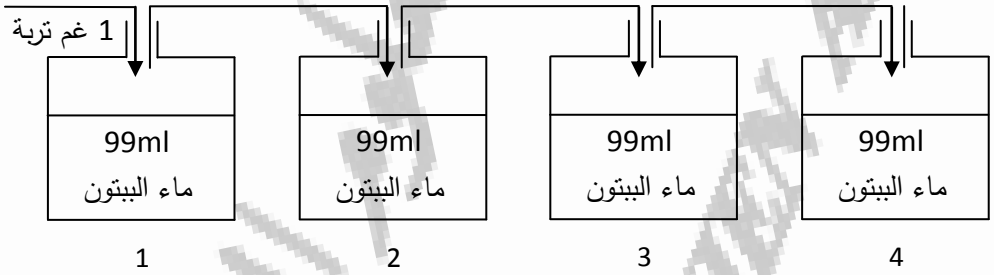
هناك طرق عديدة لعد الأحياء الدقيقة الموجودة في عينة من التربة أو المواد الغذائية أو المياه أو الحليب ويهدف من عد الأحياء الدقيقة في هذه العينات التعرف على كثافتها العددية وبالتالي مقدار تلوثها ، ويمكن تقسيم طرق العد إلى:

1 - الطريقة المباشرة Direct Method
2 - الطريقة الغير المباشرة Indirect Method

الطريقة التي سوف يتم دراستها هي طريقة عد الأطباق القياسية Standard Plate Count ويعبر عنها بمختصر (Spc) والتب تعد من الطرق الغير مباشرة وتتلخص خطوات العمل فيها بما يلي :

أولاً : تحضر سلسلة من التخافيف العشرية preparation of Serial decimal dilution وذلك باتباع الخطوات التالية :

1 - يضاف 1غم أو 11 غم من التربة أو 11 ملليلتر من الحليب إلى قنينة التخافيف الأولى الحاوية على 99 ملليلتر من ماء الببتون Peptone (يحضر بأذابة 0.1 غم في 100 ملليلتر ماء مقطر) ، ترج القنينة رجاً قوياً للحصول على مزيج متجانس .
2 - ينقل 1 ملليلتر من محلول القنينة الأولى وبوساطة ماصة معقمة (وتحت ظروف معقمة) إلى قنينة التخفيف الثانية والحاوية أيضاً على 99 ملليلتر من ماء الببتون وترج القنينة رجاً جيداً .
3 - تكمل بقية التخافيف وبنفس الطريقة إلى حين الوصول إلى التخفيف المناسب وكما هو موضح أدناه :



رقم القنينة	1	2	3	4
مقدار التخفيف		1	1	

حيث يتم حساب مقدار التخفيف لكل مرحلة من المراحل حسب القانون الآتي :

$$\text{تخفيف المرحلة} = \frac{\text{الكمية او الحجم المنقول}}{\text{الحجم النهائي}} \times \text{تخفيف المرحلة السابقة}$$

على سبيل المثال : لو أردنا ايجاد التخفيف في القنينة رقم 3 فيتم تطبيق القانون كما يلي :

$$10^{-6} = \frac{1}{1000000} = \frac{1}{10000} \times \frac{1}{100} = \frac{1}{10000} \times \frac{1\text{مل}}{1\text{ مل}+99\text{ مل}}$$

وهكذا بنفس الطريقة يتم ايجاد التخافيف الأخرى

ان 10^{-2} ، 10^{-6} ، 10^{-8} يعني ان العينة تم تخفيفها بهذا المقدار وبالتالي يعني ان مقدار الأحياء الدقيقة الموجودة في العينة قد تم تخفيفها بهذا المقدار .

عند أخذ 11غم أو 11ملليلتر من العينة فيكون لدينا التخفيف الأول : $\frac{1}{10} = 10^{-1}$ وكما هو موضح أدناه :

$$10^{-1} = \frac{1}{10} = \frac{11}{110} = \frac{11\text{ غم}}{11\text{ غم}+99\text{ مل}}$$

وعند نقل 1 ملليلتر من قنينة التخفيف الأولى والحاوية على العينة المخففة بمقدار$\frac{1}{10}$ يكون التخفيف الثاني أي $\frac{1}{100} = 10^{-2}$:

$$10^{-2} = \frac{1}{100} = \frac{1}{10} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{10} \times \frac{1}{110} = \frac{1}{10} \times \frac{11}{99+11}$$

وهكذا بنفس الطريقة نستمر لحين الحصول على التخفيف المناسب .

س: ما هو الهدف من استخدام ماء الببتون peptone water بتركيز 0.1% في عملية التخفيف؟

ج : للمحافظة على البكتريا الضعيفة فسلجياً عند إجراء التخفيف .

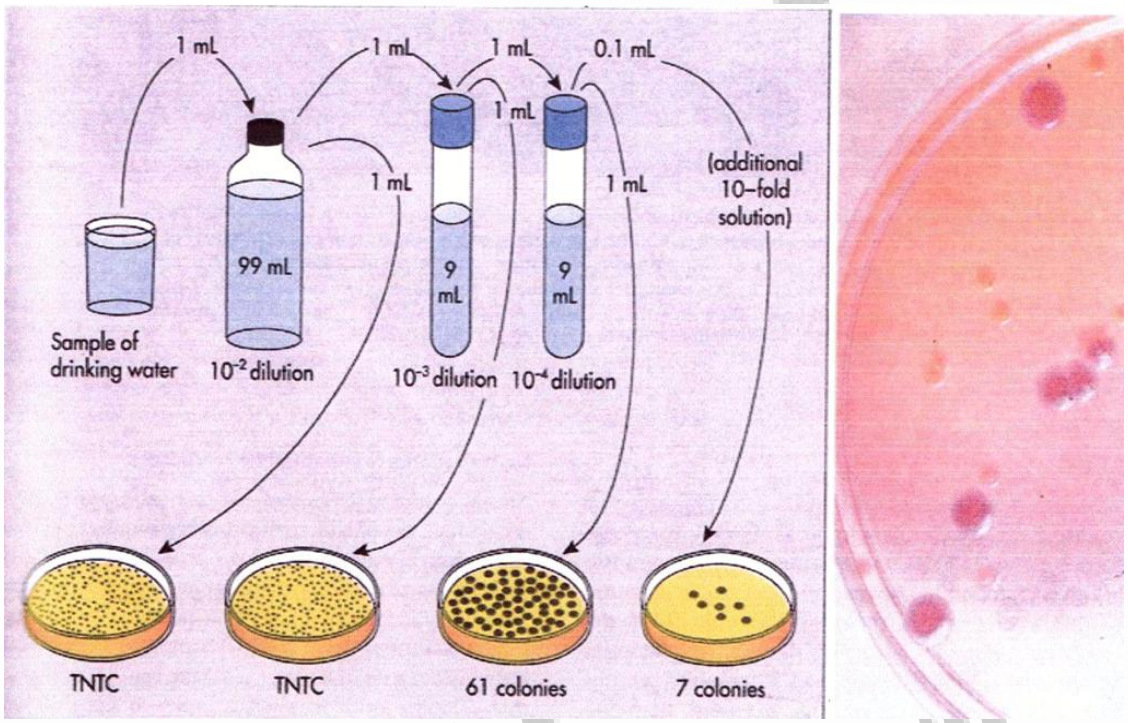
ثانياً : صب الأطباق Plate Pouring

1 - يؤخذ 1 ملليلتر من التخافيف الأخيرة على اعتبار ان التخافيف الأولى تحتوي على أعداد كبيرة من الأحياء الدقيقة يصعب عدها ، لذلك نفرض اننا نقلنا 1 ملليلتر من التخفيف 10^{-4} إلى طبق بتري معقم ونعمل له مكرر أي نأخذ 1 ملليلتر من نفس التخفيف ووضعه في طبق بتري آخر ، تكرر نفس العملية على التخفيف 10^{-6} وكما موضح في الشكل (15):

- يستخدم في عملية النقل ماصة معقمة وتتم العملية تحت ظروف معقمة .
- عند نقل 1 ملليلتر مثلاً من التخفيف 10-4 إلى الطبق يعني اننا نقلنا أحياء مجهرية مخففة بنفس المقدار أي 10-4 ، أما عند نقل 0.1 ملليلتر من التخفيف 10-4 إلى الطبق فيصبح لدينا في الطبق تخفيف 10-5 ، لأننا أخذنا عشر الكمية أي عشر $\frac{1}{10000}$ أي بمعنى :

2 - يضاف إلى كل طبق من الأطباق الأربعة الوسط الغذائي Nutrient Agar بمقدار 10-20 ملليلتر في كل طبق وتدور الأطباق يميناً ويساراً أو بحركة دائرية باتجاه عقرب الساعة وبعكسه لخمس مرات لغرض مزج العينة مع الوسط داخل الأطباق . يصب الوسط إلى الأطباق وهو بدرجة حرارة 45م° تقريباً وفي ظروف معقمة .

3 - تترك الأطباق إلى ان يتصلب الوسط ثم توضع في الحاضنة بصورة مقلوبة بدرجة حرارة 35 – 37م° لمدة 48 ساعة .



شكل (15): خطوات عد الأحياء الدقيقة بوساطة طريقة الأطباق القياسية

ثالثاً : حسابات الطريقة

تؤخذ الأطباق التي تتراوح فيها عدد المستعمرات من 30 -300 مستعمرة بعين الاعتبار مع إهمال الأطباق التي تزيد فيها عدد المستعمرات عن 300 او يقل فيها عدد المستعمرات عن 30 ، لأن زيادة المستعمرات عن 300 يعني احتمال حصول تنافس بين الأحياء الدقيقة وعدم نمو الأحياء الدقيقة الضعيفة غير القادرة على التنافس على المواد الغذائية في الاطباق ، أما ما قل عن 30 فأنه لا يمثل الأنواع المختلفة من الأحياء الدقيقة في العينة .

يطبق القانون التالي لإيجاد عدد البكتريا أو الأحياء الدقيقة في 1 غم من العينة:

عدد الأحياء الدقيقة / غم في العينة = معدل عدد المستعمرات في الطبق × مقلوب التخفيف

يطرح عادة الأحياء الدقيقة الناتجة من القانون السابق من عدة المستعمرات في طبق Control الذي يحتوي فقط على الوسط الغذائي أي لا يحتوي على أي عينة والذي يحضن تحت نفس الظروف التي تحضن فيها الأطباق الحاوية على التخافيف وذلك للتخلص من الأحياء الدقيقة التي يكون مصدرها التلوث .

س: ما هو الفرق بين الطرق المباشرة والغير مباشرة ؟

الطرق المباشرة	الطرق غير المباشرة
1- تستخدم في عدد الأحياء الدقيقة المجهرية في عينات معينة (كالحليب مثلاً) .	1- تستخدم في عد الأحياء الدقيقة في كافة أنواع العينات (التربة ، الحليب ، ....) .
2- لا يمكن تمييز الخلايا الميتة عن الخلايا الحية .	2- تعد طريقة خاصة لحساب عدد الأحياء الدقيقة الحية في العينة فقط دون الميتة لأن الأخيرة لا تكون مستعمرات في الأوساط الزرعية.
3- تعد طريقة سريعة في عد الأحياء الدقيقة .	3- تحتاج هذه الطريقة إلى وقت طويل .
4- لا يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والاعفان .	4- يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والأعفان وذلك بتغير الوسط الغذائي N.A واستخدام الوسط PDA بدلاً عنه والخاص بتنمية الخمائر والأعفان .
5- لا يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء الدقيقة حسب درجات الحرارة الملائمة لنموها .	5- يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء الدقيقة حسب درجات الحراة الملائمة فمثلاً : البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic أو البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة Mesophilic وذلك بحضن الأطباق في درجات الحرارة الملائمة لنموها والتي هي على التوالي : (45 ، 15 ، 37) م° .

المختبر الثاني عشر

طرائق عزل وتنقية الأحياء المجهرية

Isolation & purification Method of Microorganisms

تتطلب الخطوة الأولى في أي دراسة تتناول أي كائن مجهري ، فصل ذلك الكائن عن اشكال الحياة الأخرى كافة بحيث يعدو في بيئته المختبرية الجديدة وحيداً ، معزولاً عن غيرها ، ونقياً وتسمى هذه الخطوة بعملية العزل في مزرعة نقية Isolation in pure culture وهذا يعني ضمناً ان الهدف من عملية العزل Isolation والتنقية Purification هو الحصول على مزرعة نقية Pure Culture مزرعة تحتوي على نوع واحد فقط من الأحياء الدقيقة وهي خطوة لها أهميتها الاستثنائية لتجنب الوقوع في الأخطاء عند تشخيص الكائن المجهري ، وفي الدراسات الفسلجية والحيوية الأخرى حول ذلك الكائن وتسمى المزرعة النقية هذه بالعزلة Isolate لحين تشخصيها على مستوى الجنس والنوع .

ومعروف ان الأحياء الدقيقة تتواجد في بيئاتها الطبيعية كالتربة مثلاً ، أو على صورة تشكيلية مختلطة من الكائنات تختلف في حجومها وأشكالها وتمثل هذه التشكيلية المختلطة ما تعرف بالجماعة أو المزرعة المختلطة Mixed population أو Mixed culture ويمكن الحصول على مزارع مختلطة في مختبرات الأحياء الدقيقة عند زرع عينة من التربة مثلاً في وسط زرعي صلب عام مثل Nutrient Agar اذا تنشأ على سطح هذا الوسط مستعمرات متعددة الأشكال والأحجام والألوان . فالبكتريا التي تعود إلى الجنس والنوع نفسها غالباً ما تكون مستعمرات متماثلة ومتشابهة إلى حد كبير على الأوساط الغذائية نفسها . ويتم تحضير مزارع نقية من المزارع المختلطة هذه بالتقاط مستعمرة مقصودة بوساطة ويتم الالتقاط والنقل بطرائق خاصة ستذكر لاحقاً .

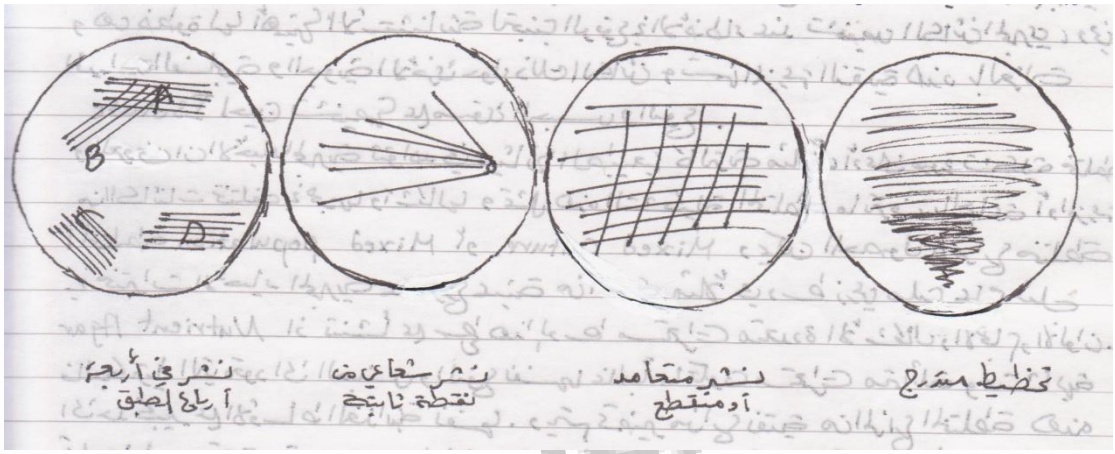
وكان ابتكار تقنيات المزرعة النقية انجازاً كبيراً حقق قفزات نوعية في عالم الأحياء الدقيقة حتى يمكن القول ان العصر الذهبي لهذا العام قد بدأ مع بداية مفهوم الزرعة النقية كان الطبيب الألماني روبرت كوخ Robert Koch الحائز على جائزة نوبل عام 1905 أكثر من ساهم في تطوير تقنيات لغرض دراستها وتشخيصها وقد تحقق هذا الأمر لديه باستخدام الأوساط الصلبة ، ويذكر ان كوخ قد استخدم مادة الجيلاتين بادئ الأمر لتصليب الأوساط الزرعية بيد انه استعان لاحقاً بمادة الأكار Agar فيما بعد وبناءاً على اقتراح من Frau Hesse المولودة في نيوجرسي وهي زوجة أحد مساعدي كوخ .

المزرعة النقية :

يمكن الحصول على مزارع نقية بطريقتين أساسيتين هما :

1 - تنقية التخطيط في الأطباق Streak Plate Technique
وهي أبسط التقنيات المستعملة في تنقية الأحياء الدقيقة ولاسيما البكتريا والحصول عليها بصورة نقية مفردة ويمكن انجازها باتباع الخطوات التالية :

- يحضر وسط زرعي صلب مثل Nutrient Agar ويعقم ويبرد ثم يصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة وبترك لحين التصلب التام .
- ينقل مسحة مليء أبرق التلقيح Loop full من مستعمرة مميزة في مزرعة مختلطة وتخطط على سطح الوسط الزرعي الصلب المحضر في الخطوة السابقة ويكون التخطيط برفق وبأحد الاشكال الموضحة في الشكل (16) أدناه:

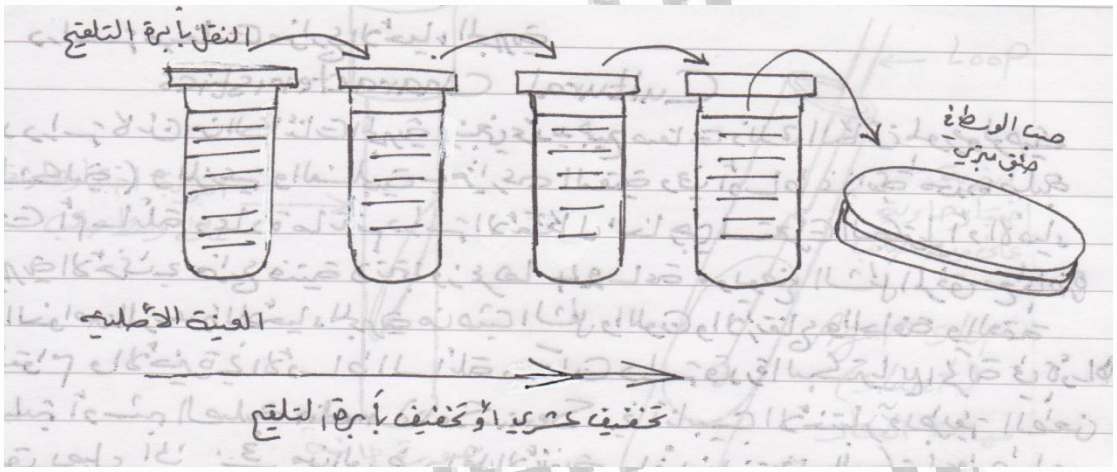


شكل (16): أشكال التخطيط

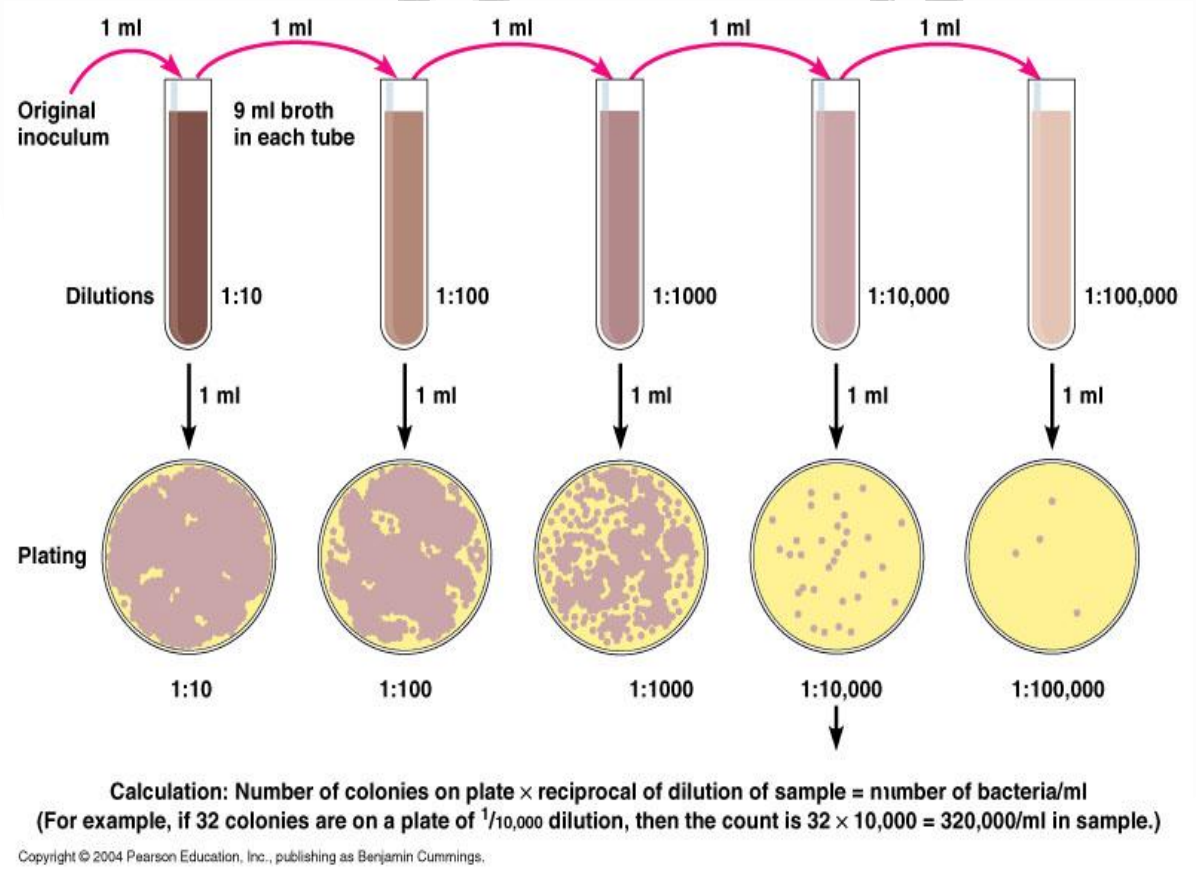
ويوضح الشكل الاتي خطوات طريقة التخطيط

2 - تقنية الصب في الأطباق Pour Plate technique

وهي طريقة أخرى للحصول على مستعمرات معزولة مفردة ، وفيها تمزج مسحة من احدى المستعمرات المراد تنقيتها بوساطة إبرة التلقيح مع وسط زرعي صلب مثل Nutrient Agar المحضر في أنابيب اختيار بعد تبريده إلى 50م° أي قبل تصلبه بقليل . ثم يصب مزدج البكتريا والوسط في أطباق بتري معقمة وتحضن في حرارة مناسبة ولمدة مناسبة فتنشأ على سطح الوسط مستعمرات مفردة ومتماثلة أو متشابهة . ويمكن إجراء سلسلة من التخافيف في الوسط الزرعي الصلب في الاختبار قبل صب الوسط في أطباق بتري بغية تخفيف أو تقليل عدد المستعمرات التي تنمو في الأوساط داخل الاطباق ، كما موضح في الشكل (17) أدناه :



شكل (17): طريقة اجراء سلسلة التخافيف



حفظ المزارع النقية وإدامتها :

عند الحصول على المزارع نقية لبكتريا معينة يفضل حفظ هذه المزرعة بطريقة معينة تحول دون تلوثها وتعطيها الإدامة والديمومة لفترة ليست بقصيرة بغية إعادة تنشيطها للاستفادة من الأغراض الدراسة . تحفظ المزارع النقية في ممالات من الوسط الصلب الملائم Slant إذ تحفظ في الثلاجة مع تجديد الممالات بين فينة وأخرى لا تتجاوز 3 أشهر بالنسبة للبكتريا . ويفضل حفظ المزارع في Slant أكثر من الأطباق ذلك لأن الممالات (في أنابيب اختبار) أقل عرضة للتلوث وأقل اشغالاً للحيز داخل الثلاجة وأسهل تداولاً .

تحضر الممالات بإذابة الوسط الزرعي الصلب إذابة تامة في حمام مائي ، ثم يوزع في أنابيب اختبار ويعقم في 121°م/15 دقيقة في جهاز المؤصدة ثم تترك أنابيب الاختبار بصورة مائلة في جو المختبر ليتصلب الوسط فيه . ثم تخطط البكتريا المراد حفظها على سطح الوسط .

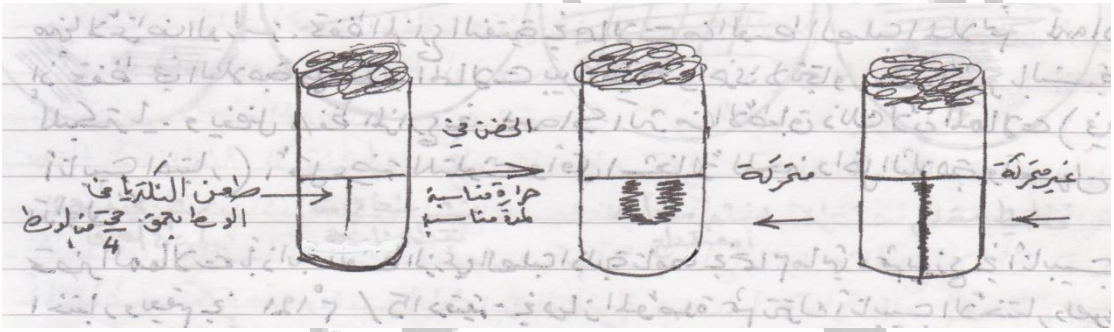
تحضن الأنابيب في حرارة مناسبة لزمن مناسب وحسب نوع البكتريا ودرجة حرارتها المثلى ثم تحفظ بالثلاجة . وتجدد المزارع في الممالات كل ثلاثة أشهر .

وهناك العديد من الأحياء الدقيقة لا ينصح بحفظها في ممالات صلبة حاوية على مادة الأكار مثل الطحالب والابتدائيات Protozoa والعاثيات أو الفاجات لذلك تحفظ هذه المزارع في أوساط سائلة وتسمى عندئذ بـLiquid culture.

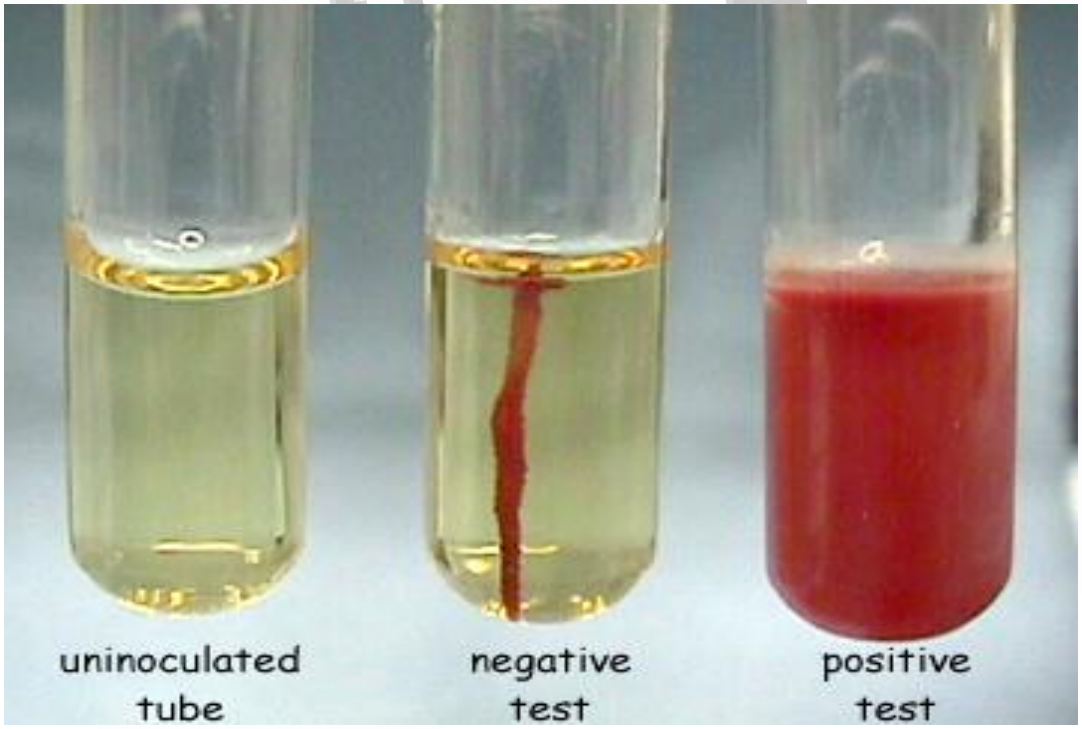
المختبر الثالث عشر

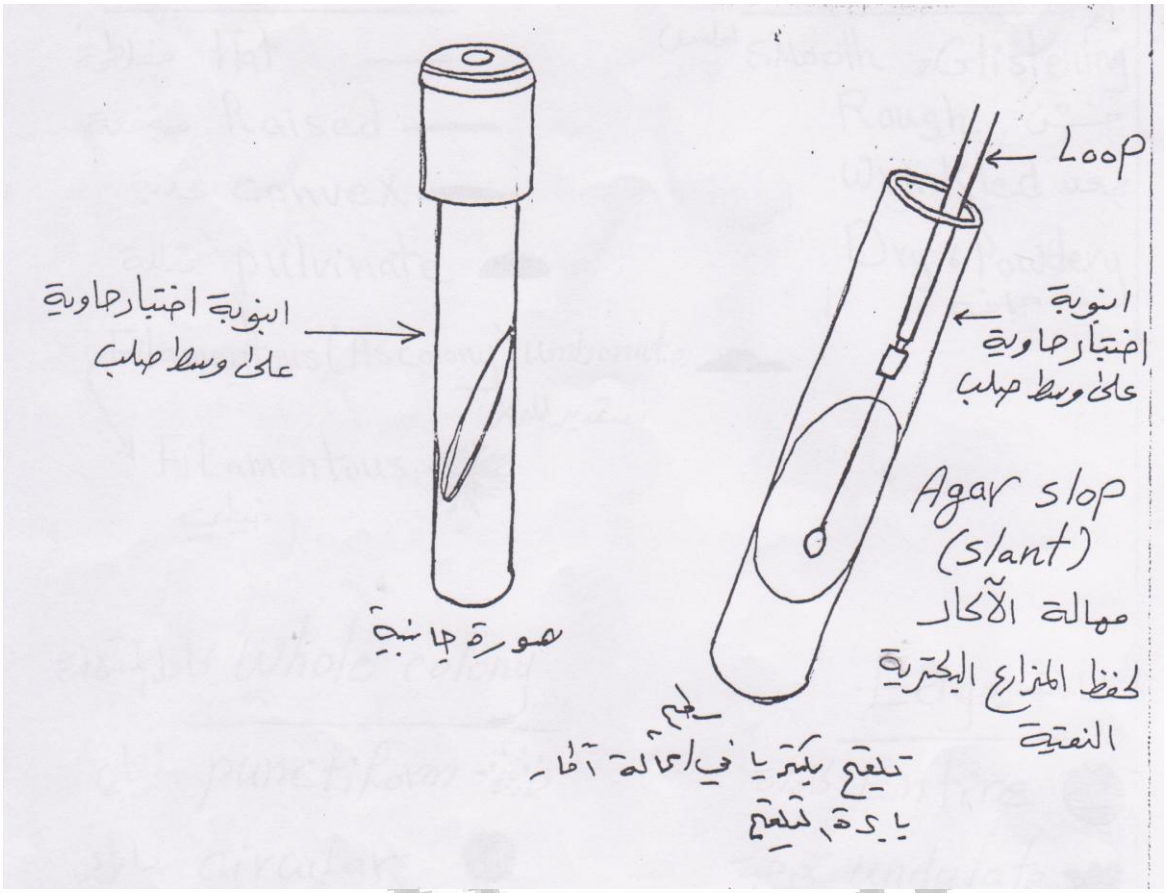
دراسة صفات مزارع الأحياء الدقيقة **Culture characteristics**

عند دراسة كائن من الكائنات المجهرية ينبغي تحديد جميع صفات ذلك الكائن المورفولوجية (الشكلية) والمزرعة والفسلجية في مزارعه النقية وفي أوساط غذائية محددة صلبة كانت أم سائلة وعادة ما تتم دراسة الشكل الخارجي لمستعمرات البكتريا أو الأحياء الدقيقة الأخرى في مزارع فنية لا تتجاوز عمرها 24 ساعة ، ويوضح الشكل المرفق مع المحاضرة أهم الخواص الزرعية للأحياء المجهرية من حيث الشكل واللون والأرتفاع والحافة والعتمة والقوام والاخيرة في الاوساط السائلة . ويمكن دراسة قدرة البكتريا على الحركة في الأوساط الصلبة او شبه الصلبة Semi – Solid media في أنابيب الاختبار وبطريقة الطعن وبعمق يصل إلى $\frac{3}{4}$ من الوسط داخل الأنبوبة . إذ ان انتشار البكتريا على طول منطقة الطعن تعطي تصوراً عن مدى قدرة انتشارها بفعل قابليتها على الحركة بالأسواط ، كما في الشكل (18)، (19)، (20).

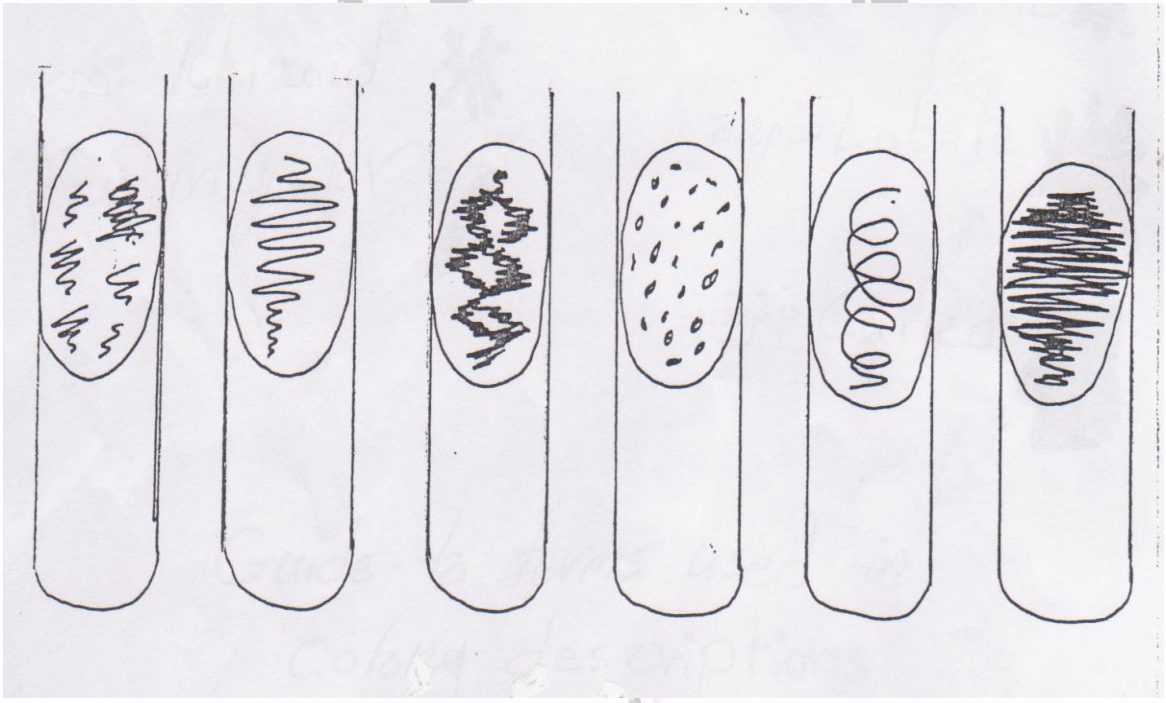


شكل (18): طعن البكتريا





شكل (19): تلقيح بكتريا بممالة آكار بواسطة أبرة التلقيح



شكل (20): أنماط نمو مختلفة في ممالة الأكار لأنواع مختلفة من الأحياء الدقيقة (بكتريا)

Elevation الارتفاع	**Surface السطح**
Flat مفلطحة	Smooth املس ، Glistening ناعم
Raised مرتفعة	Rough خشن
Convex محدبة	Wrinkled مجعد
Pulvinate متللة	Powdery ، Dry جاف
Filamentous خيطي (Ascolony) umbonate مستدير المركز	

Whole colony كامل المستعملة	Edge الحافة
Punctiform نقطي	Entire كاملة
Circular دائري	Undulate متعرجة
Rhizoid جذيري	Lobate مفصصة
Irregular غير منتظم	Curled خثرية

Guide to terms used in colony descriptions

دليل المفردات المستخدمة في وصف مستعمرات البكتريا في الاطباق من حيث

1 - سطح المستعمرة .
2 - ارتفاع المستعمرة على سطح الوسط .
3 - انتشار حدود وشكل المستعمرة .

Dr. Raheem Al-Ziadi

المختبر الرابع عشر

عزل وتشخيص البكتريا

للحصول على مزارع نقية للبكتريا تعزل أولا بتنميتها على أوساط زرعيه مغذية صلبة مثل وسط الببتون ومستخلص اللحم والخميرة أو على أي وسط ملائم ثم يتم تنقيتها بإحدى الطرق التالية :

1- طرق تقوم على أساس الفصل الميكانيكي للكائن ألمجهري Mechanical Spearation of Microorganismes وتعتبر هذه الطريقة الأكثر استعمالا.

2- طرق بايولوجية Biological method

أولا: الطرق الميكانيكية:

وتتميز بفصل خليط من الخلايا أو مجموعة من الخلايا إلى خلايا معزولة بتنميتها في وسط زرعي ملائم وبعد إن تنمو هذه الخلايا إلى مستعمرات تنقل إلى سطح الوسط الصلب لتنقيتها. ويمكن الحصول على مزارع نقية وذلك باستخدام طريقة التخافيف وصب الأطباق ثم استعمال طريقة التخطيط أو النشر للتأكد من مدى نقاوتها . ثم تحفظ كمزارع نقية على أوساط في أنابيب اختبار بصورة مائلة من الوسط ألزرعي.

ثانيا : الطرق البايولوجية Biological method:

تقوم على أساس الاختلاف في الصفات الميكروبية وتستعمل لأغراض معينة فقط وهي تستعمل في العادة للحصول على مزارع نقية للبكتريا المكونة للسبورات فقط الموجودة مع البكتريا الغير مكونة للسبورات. وفي هذه الحالة تترك المزارع المختلطة مدة من الزمن للسماح بإكمال تكوين السبورات ويتم التأكد من ذلك بالفحص ألمجهري. إذ يتم نقل جزء من البكتريا النامية على الوسط إلى أنبوبة تحوي ماء معقم ويمزج جيدا ويوضع في حمام مائي ويترك بدرجة الغليان لمدة 2-3 دقائق. وبعدها بدرجة حرارة 80 ^{O}م لمدة 10 دقائق. ثم يزال ذلك ويوضع مباشرة في ماء بدرجة حرارة الغرفة ويزرع منه في الوسط ألزرعي الصلب ويوضع في الحاضنة بدرجة حرارة 37 ^{O}م. فتنمو عندئذ البكتريا المكونة للسبورات فقط .كما تستعمل الطرق البايولوجية لفصل الأحياء المجهرية اللاهوائية عن الهوائية .

بعد العزل والتنقية تبدأ عملية التشخيص والتي تتضمن عدد من الخصائص التشخيصية وكالاتي:

1- الخصائص المظهرية Morphological Properties

تشمل دراسة خصائص المستعمرات وصفاتها المظهرية بما فيها الشكل والحجم والارتفاع والقوام واللون والقابلية على إنتاج الصبغات والرائحة وغيرها .

2- الخصائص المجهرية Microsopic Properties

وتتضمن دراسة شكل البكتريا تحت المجهر ودراسة قابليتها على إنتاج السبورات وكيفية تجمع الخلايا فضلا عن استجابة البكتريا لصبغة كرام (Ge+, Ge-) .

3- الخصائص الكيموحيوية Biochemical Properties

تشمل عدد من الاختبارات التشخيصية مثل اختبار إنزيم الكاتليز والاوكسيديز والاندول واليوريز واختبار الحركة وتحلل الجيلاتين والنشا والدم واختبار تحلل السكريات وغيرها من الاختبارات المهمة.

4-الخصائص المصلية Serological Properties

وتتضمن دراسة صفات وطبيعة الانتجينات Antigens السطحية والتي تظهرها الأجسام المضادة Antibodies المناسبة والمحددة لها وهذه الصفات دقيقة ومتخصصة لأنها تعتمد على الصفات الوراثية (الجينات) .

إن دراسة الخصائص المظهرية غالبا ما تتأثر بنوع الوسط ألزرعي للمستعمرات النامية على أوساط زرعيه انتخابية Selective media إذ إن لأغلب مجاميع البكتريا وسط انتخابي خاص تنمو عليه كل مجموعة بحيث لها صفات شكلية تميزها عن غيرها وفي بعض الأحيان تثبط نمو المجاميع الأخرى من البكتريا وكما مبين كالأتي :

1- بكتريا *Staphylococci* مستعمرات صفراء كبيرة على وسط Manitol salt agar

2- بكتريا *Streptococci* مستعمرات ناعمة شفافة كرأس الدبوس على وسط Sheep blood agarأو Sodium Azid agar

3- بكتريا *Vibrio*) ThioSulphat Citrate Bile –Salt (TCBS) Sucrose agar

4- *coliform bacteria* أو broth McConkey او McConkey agar مستعمرات ذات لون وردي Pink colour

5- بكتريا *Pseudomonas* : King –B او Pseudomonas agar مستعمرات شفافة ناعمة .

6- بكتريا *Salmonella*: (SS agar) Salmonella Shigella مستعمرات شاحبة

Xyloselysine-Deoxy cholate (XLD مستعمرات حمراء

فطريات المياه الملوثة والمجاري

الفطريات الموجودة في مثل هذه المياه لها أهمية في تحلل الفضلات الغنية بالمواد العضوية وهناك أنواع من الاعفان مثل:

1. *Leptomitus lacteus*
2. *Geotrichum candidum*
3. *Fusarium aquaedudenum*

لها فعالية ايضية متميزة تجعلها قادرة على النمو والتكاثر في مثل تلك الظروف من التلوث . إن المجاميع المختلفة من الاعفان الموجودة في مثل هذه المياه تتضمن : فطريات التربة والفطريات المائية المفترسة وفطريات مرضية أخرى تنتمي إلى مجاميع مختلفة هي :

و EuAscomycetes و HemiAscomycetes و Predaceous fungi Imperfect fungi
Phycomycetes و و Ascomycetidae

الاعفان المائية Pathogenic fungi

يعطي العزل الروتيني للمياه الملوثة أربع أنواع معروفة بامراضيتها للإنسان وهي :

1. *Geotrichum candidum*
2. *Phialophora jeanselmei*
3. *Trichosporium heteromorphum*
4. *Aspergillus fumigatus*

الذي يكون عدد كبير من السبورات ويسبب مرض Aspergillosis وPetriellidium boydii الذي يمكن إن يصيب العظام بما يسمى Madura foot عند دخول الجروح العميقة . كما يمكن إن يعطي العزل أنواعا مختلفة من الاعفان المرضية أمراضية للنباتات إلا انه لا يوجد دليل على إمكانية حدوث إصابات واسعة للنبات عن هذا الطريق .

المختبر الخامس عشر

الفحص المايكروبايولوجي للماء

Bacteriological examination of water

يعد الماء صالحاً للشرب متى ما كان خالياً من الأحياء الدقيقة الممرضة Pathogenic التي يحتمل انتقالها عن طريق الماء مثل مسببات حمى التيفوئيد والزحار البكتيري والهيضة أو الكوليرا وغيرها من المسببات بما في ذلك بعض أنواع الفايروسات كشلل الأطفال Polio والتهاب الكبد Hepatitis .

ان المسببات المرضية لا تتواجد في الماء الا اذا كان الماء ملوثاً ببراز الإنسان المريض ولما كان الكشف هذه المسببات يحتاج إلى وقت ومهارة ومواد قد لا تتوفر في بعض المختبرات لذلك يصار إلى التحري عما جرى على تسميتها ببكتريا الكشف Indicator ومنها بكتريا القولون Coliform Bacteria والتي تشتمل على جميع أنواع البكتريا التي تتصف بأنها عضوية وهوائية ولا هوائية اختباراً Facultatively anaerobic وسالبة لصبغة كرام Gram negative وغير مكونة للسبورات non-sporeforming وتنتج (تخمر) غاز وحامض من سكر اللاكتوز خلال مدة أقصاها 48 ساعة في 35م° ومن أكثر هذه المجموعة Coliform group شيوعاً وانتشاراً السلالات المختلطة لبكتريا *Escherichia Coli* و *Enterobacter aerogenes* وهذه الأنواع تتواجد في أمعاء الإنسان السليم والمريض معاً وان ملايين منها تطرح يومياً مع البراز ان وجود مجموعة القولون Coliform group في ماء الشرب عليه ، يعد دليلاً على احتمال تلوث الماء بالبكتريا المرضية ذلك لأن مصدر تلوث الماء بمجموعة القولون قد يكون براز إنسان سليم أو مريض . وتمتاز مجموعة القولون بأنها أطول عمراً من البكتريا الممرضة في الماء وهذا يوفر فرصة أكبر للكشف عن احتمالات التلوث.

خطوات الفحص عن بكتريا القولون، كما في المخطط

1 - الفحص الاحتمالي Presumptive test

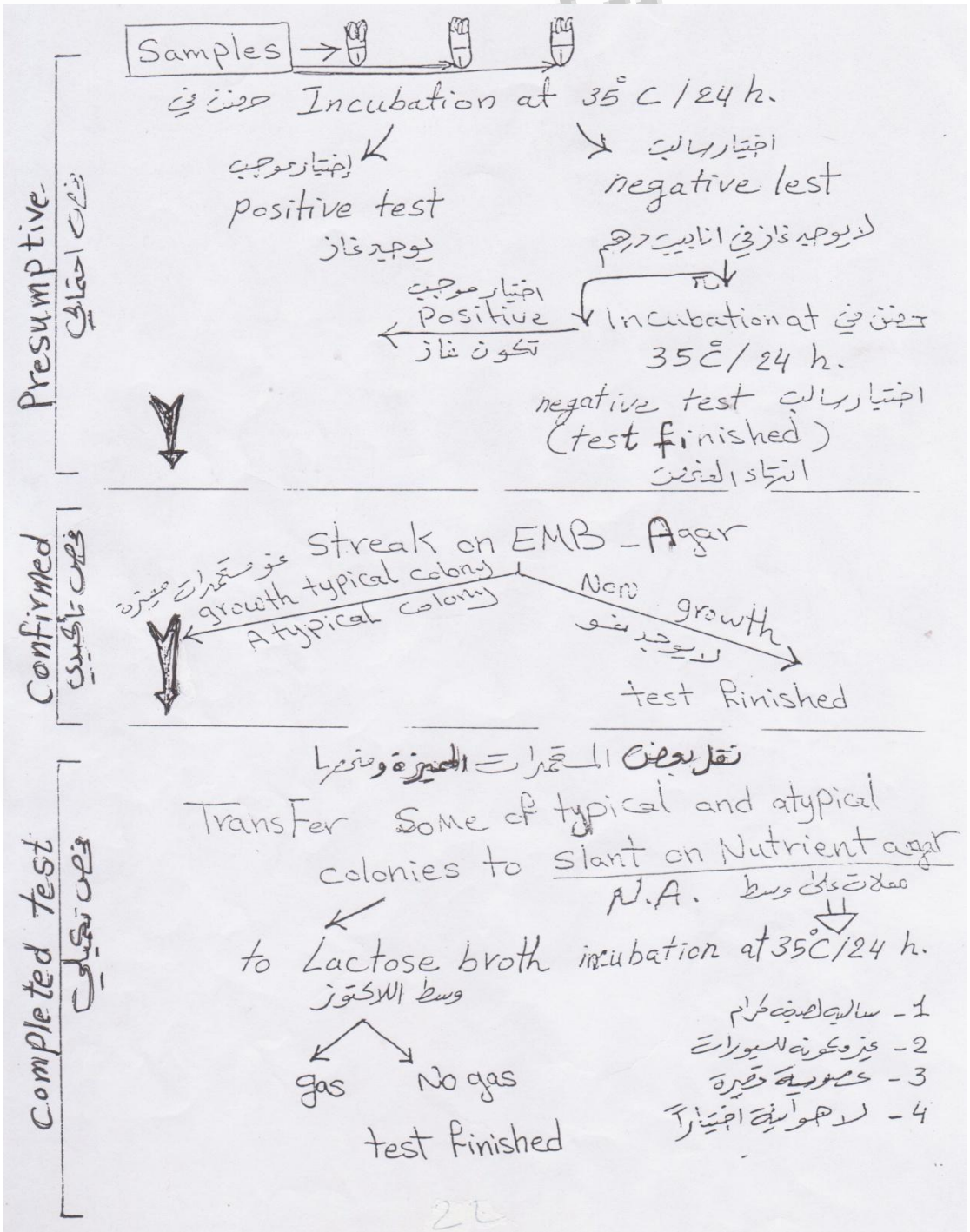
ينقل ملليلتر واحد من الماء قيد الفحص إلى أنابيب اختبار يحتوي على 5 ملليلتر من Lactose Broth وعلى أنابيب صغيرة موضوعة بصورة مقلوبة في داخل هذا الوسط السائل تعرف بـ Durham tube (أنابيب درهام) تحضن الأنابيب بدرجة 35م° ويلاحظ تكون الغاز الذي يعد دليلاً أولياً على وجود مجموعة القولون . تنقل هذه الأنابيب إلى مرحلة الاختبار الآتية اما الأنابيب الخالية من الغاز فتعاد إلى الحاضنة (35م°) مدة 24 ساعة أخرى للتأكد من خلوها من مجموعة القولون (وبالتالي من المسببات المرضية) بعدم تكون الغاز .

2 - الفحص التأكيدي Confirmed test

تنقل مسحة من وسط Lactose Broth الموجب الاختبار الاحتمالي بوساطة Loop وتخطط على سطح أحد الأوساط المتخصصة مثل (Eosin Methylene Blue Agar (ENB أو ENB – Agar ، وتحضن الأطباق في 35م° لمدة 24 ساعة مع ملاحظة تكون مستعمرات تعود إلى مجموعة القولون ولاسيما *E.Coil* وهذه البكتريا تكون على وسط EMB – Agar مستعمرات خضراء لماعة معدنية Metalic ومستعمرات بكتريا *aerogens* تكون بنفسجية كبيرة الحجم ، وفي حالة عدم ظهور مستعمرات بالمواصفات التي ذكرت يتم الانتقال إلى المرحلة الأخيرة .

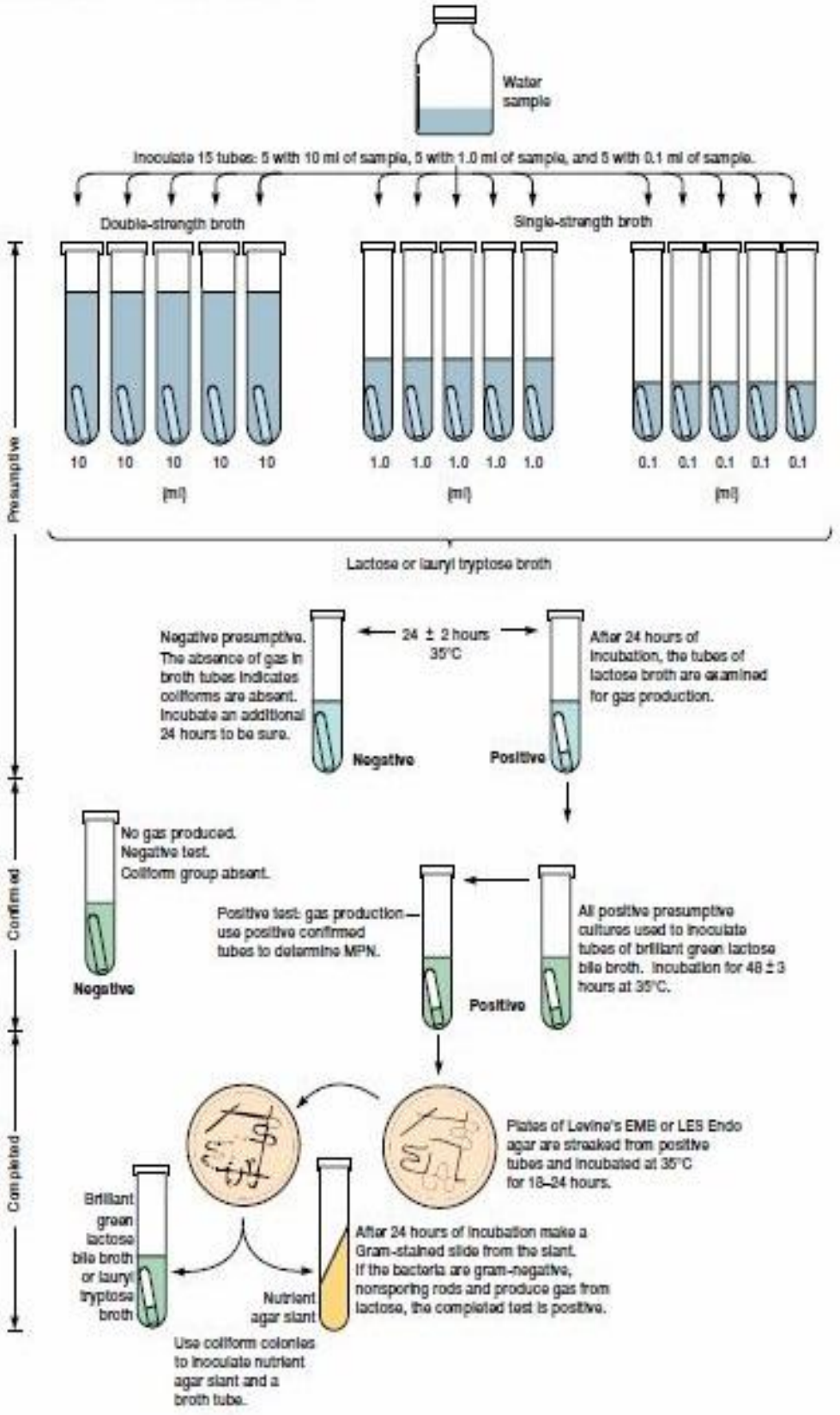
3 - الفحص التكميلي Completed test

يتم انتقاء عدد من مستعمرات بكتريا القولون ومستعمرات لا تمثل مجموعة بكتريا القولون إلى الوسط Lactose broth وكلاً على انفراد وتحضن في 35م° لمدة 24 ساعة لملاحظة تكون الغاز . كما تنقل مسحة من المستعمرات التي وقع عليها الاختبار إلى الوسط Nutrient Agar على شكل Stant وتحضن في 35م° لمدة 24 ساعة ثم تجري عليها الفحوصات المجهرية للتأكد من عائديتها إلى مجموعة بكتريا القولون من حيث أنها عضوية ، سالبة لصبغة كَرام ، غير مكونة للسبورات .



شكل (21): مخطط الخطوات المتبعة في فحص الماء.

The Most Probable Number (MPN) Procedure for Water Examination for the Presence of Coliforms by the Presumptive, Confirmed, and Completed Tests.



المختبر السادس عشر

تأثير العوامل الكيميائية على الأحياء المجهرية

Effect of chemicals on microorganisms

فحص الحساسية للمضادات الحيوية

Antibiotic sensitivity test

المضادات الحيوية هي مركبات تفرز من قبل بعض الأحياء الدقيقة وتمثل نواتج الأيض الثانوية secondary metabolites التي تتكون في طور الثبات Stationery phase ولا تعرف فائدة هذه المواد بالنسبة للأحياء المجهرية التي تفرزها وتستخدم لمعالجة الأمراض التي تسببها الأحياء الدقيقة حيث تكون هذه المضادات اما قاتلة أو مثبطة لنموها ، والمضادات الحيوية تقسم إلى مجاميع اعتمادا على طريقة تأثيرها على الأحياء الدقيقة فهناك مضادات تؤثر على الجدار الخلوي وأخرى على الرايبوسومات وهكذا .

ومن امثلة الأحياء الدقيقة المنتجة للمضادات الحيوية هي :

1 - البكتريا وخصوصاً التابعة لجنس Bacillus
2 - الاعفان التابعة لجنس Penicillium
3 - Actinomycetes من أهمها Streptomyces وتشكل 90% من المضادات المستخدمة في الوقت الراهن .

الأهداف التي تؤثر عليها المضادات في الخلايا البكتيرية :

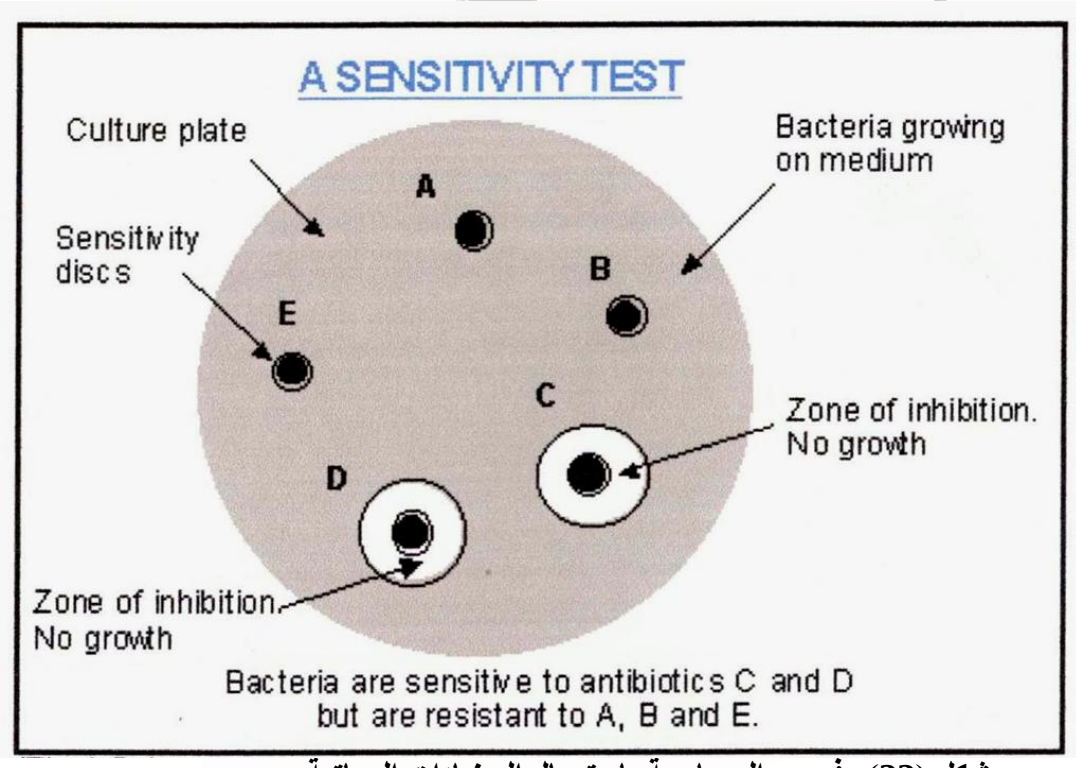
1 - الجدار الخلوي Cell wall اهم جزء فيه هو peptidoglycan يؤثر عليه Pencillin و Ampicillin و Cephalosporin ان الإصابة بالإسهال سببها G^- الحاوية على كمية قليلة من Peptidoglycan ، اما التهاب اللوزتين اصابتها تنتج عن بكتريا G^+ الحاوية على كمية كبيرة من Peptidoglycan.
2 - Cell membrane : ان استخدام المضادات للأغشية الخلوية قليل جداً والسبب هو ان أغلب المضادات تقتل الخلايا بعمل ثقوب نظراً لعدم التخصص الدقيق في عمل المضادات على الغشاء الخلوي قد تكون سامة لخلايا الجسم .
3 - Nucleic Acid الحوامض النووية مثل RNA ، المضاد Rifadin يمنع تخليق RNA ، ففي بكتريا السل ، مثلاً يستعمل الدواء Rifampcin ، أما DNA فأدويته أو عقاقيره قليلة جداً لأن المكتشف منها غير متخصص ويمكن ان تتدخل مع عمليات تخليق الـDNA لخلايا الإنسان مما يؤدي إلى توليد السرطان (ويمكن أحياناً استخدام هذه المواد لإيقاف السرطان) .
4 - Protein synthesis تخليق البروتينات هي عملية معقدة متشعبة جداً يشترك فيها أكثر من مكون ومركب وأنزيم مما يجعلها عملية متعددة الأهداف يمكن ان تهاجم من قبل المضادات الحيوية مثل Arthromycin و Lincomycin وكذلك Chloromphenical ومقارب لها Tetracyclin .
5 - Chelating agents بعض المضادات تسحب المواد من الخلية فتسمى الكلابية مثل Aspergillic acid يسحب Fe^{+2} ومن مضادات الفطريات Mycositity .

طرق فحص الحساسية Sensitivity test Methods

1 - Liquid Media يؤخذ وسط ملائم لنمو الأحياء بكميات متساوية ويضاف له مضاد بتراكيز مختلفة ويعقم ويلقح بكميات متساوية من البكتريا وتحضن على درجة 37م° لمدة 24 ساعة ، فاذا كان المضاد مؤثراً فأن منحني النمو يكون متناقصاً وأحياناً يلاحظ توقف النمو بتركيز محدد ويسمى Minimum Inhibition ويعرف بأنه أقل تركيز من المضادات الحيوية يمكن ان تقضي على البكتريا أو الكائن المجهري .

2 - Plate Method وفيها يتم استخدام طريقة Heavy Streak وكما يلي

– ينشر 0.1 ملليلتر (أو مسحة من Slant) من بكتريا *B.subtilis* على سطح الوسط الغذائي المتصلب Nutrient Agar في طبق بتري بوساطة قضيب زجاجي Glass rod على شكل حرف L بعد تعقيمه بالكحول واللهب وتبريده بجعله يلامس الوسط الغذائي الخالي من البكتريا ، ثم أبدأ ينشر البكتريا وفي حالة عدم توفر القضيب الزجاجي استعمل Loop لغرض نفسه .
– توضع أقراص المضادات الحاوية أو المشبعة بالمضادات الحيوية على سطح الوسط الغذائي بعد نشر البكتريا عليه ، تسجل حروف أو رموز المضادات الحيوية المثبتة على الأقراص مع الأسماء الكاملة لها في دفتر المختبر .
– احضن الأطباق في 37م° لمدة 24 – 48 ساعة .
– قارن بين مناطق التثبيط والمناطق الدائرية الخالية من النمو Clear Zone أو Inhibition Zone حول أقراص المضادات قطر من المناطق الدائرية ، حيث كلما كان القطر كبيراً كان تأثير المضاد على البكتريا كبيراً . يكرر العمل باتباع نفس الخطوات وباستخدام بكتريا أخرى سالبة لصبغة كرام *E.Coli* عادة ويلاحظ ان تأثير المضادات على بكتريا G^+ أكثر من تأثيرها على G^- ، حاول ان تفسر السبب في ضوء ما هو متوفر لديك من معلومات حول G^+ ، G^- ؟ لاحظ الشكل (22).



شكل (22): فحص الحساسية باستعمال المضادات الحياتية

تأثير الكحولات والمواد المطهرة :

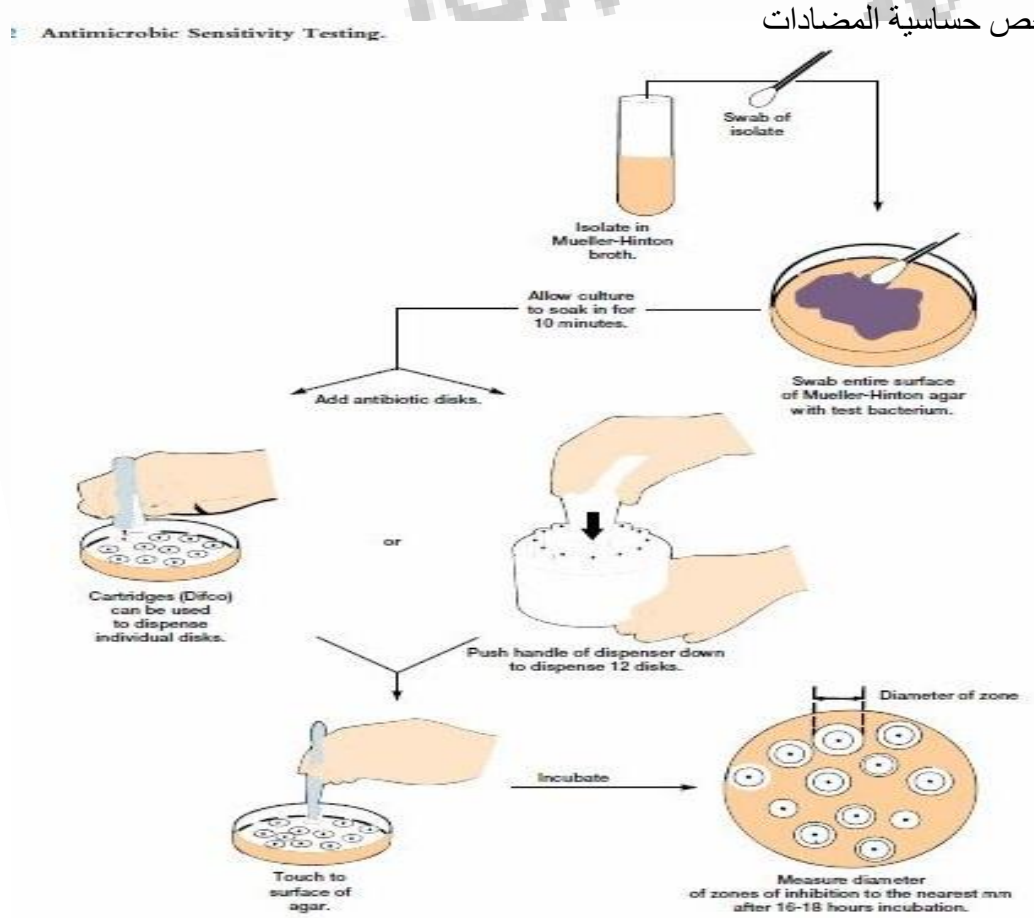
تمتلك الكحولات فعالية سريعة في قتل الأحياء الدقيقة ولاسيما الفطريات والأجزاء الخضرية من البكتريا لكن قيمتها التأثيرية قليلة ضد الأبواغ وبعض الفايروسات المهمة طبياً ، وتؤثر الكحولات على الأحياء الدقيقة من خلال :

1 - تخثر البروتينات الأساسية (الانزيمات) لذلك فهي فعالة فقط عند وجود الماء .
2 - الكحولات لها تأثير على الأحياء الدقيقة في إزالة المواد الدهنية من الجدار أو الغشاء السايتوبلازمي .
3 -تسبب الجفاف من خلال سحب الماء .

طريقة العمل :

– اتبع الخطوات المذكورة في فحص الحساسية من نشر البكتريا على سطح الوسط الغذائي Nutrient Agar .
– شبع ورقة قرصية الشكل بالكحول (الديتول أو السيبتول) المتوفر أمامك . ثم ضع الورقة على سطح الوسط الغذائي ، احضن ثم افحص قطر المنطقة وقارن النتائج .

مخطط لفحص حساسية المضادات



المختبر السابع عهشر

اختبار حساسية الميكروبات للبنسيلين

طريقة اقراص الترشيح المشبعة بالمضاد الحيوي:

ان ابسط الطرق لتقدير استجابة كائن دقيق للتأثير بمضاد حيوي هى تنمية هذا الكائن على اطباق تحتوى على البيئة المناسبة ثم يسمح للمضاد الحيوي ان ينتشر خلال المزرعة النامية على الاجار حيث تستخدم اقراص ترشيح مشبعة بالمضاد الحيوي على سطح بيئة الآجار المحتوية على الميكروب لاختبارها .

يقاس تأثير المضاد الحيوي عن طريق منطقة التضاد الخالية من نمو الميكروب على الآجار و التى تلاحظ حول قرص الترشيح و تسمى منطقة التضاد او التثبيط. و تظهر هذه المناطق شفافة خالية من الميكروب حول قرص الترشيح الذى انتشر فيه المضاد الحيوي. و يمكن قياس قطر هذه المنطقة بواسطة المسطرة

يتأثر تكوين منطقة التثبيط بالعوامل التالية:

1 - كثافة او لزوجة البيئة
2 - معدل الانتشار للمضاد الحيوي
3 - تركيز المضاد الحيوي بالأقراص
4 - حساسية الميكروب للمضاد
5 - التفاعل فيما بين المضاد الحيوي و البيئة

الادوات و المواد اللازمة:

1 - مزرعة بكتيرية تم تنميتها على سطح اطباق اجار مغذى
2 - اقراص ترشيح مشبعة بالمضاد الحيوي (البنسلين)
3 - ايثانول
4 - مسطرة مدرجة بالملليمتر
5 - ملقط

الطريقة:

1 - ننقل بواسطة جفت معقم اقراص المضاد الحيوي ووضعها على سطح الاطباق الملقحة
2 - تحضن الاطباق على 37 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة
3 - بعد الحضن تقاس منطقة التثبيط بالمسطرة و تسجل النتيجة

المشاهدة:

عند ظهور دائرة خالية من النمو البكتيري حول قرص المضاد الحيوي هذا دليل على ان الميكروب لا يستطيع النمو فى وجود هذا النوع من المضاد الحيوي .

*يؤثر المضاد الحيوي على الميكروب و يتسبب فى هلاكه عن طريق:

1 -تأثيرة على تكوين الجدار الخلوى للبكتريا

2 -او المادة الوراثية الموجودة بالميكروب

- فى حالة وجود نمو ميكروبى حول القرص فهذا دليل على ان المضاد الحيوي لا يؤثر فى مكونات الميكروب و لايمكن استخدام هذا المضاد لعلاج المرض المتسبب بهذا الميكروب

طرق دراسة المزارع

أ – التخطيط البسيط للطبقStreak plate

تجرى هذه الطريقة عندما يراد توفير المواد والوقت وعندما تزداد خبرة ومران القائم بها حيث أن إتباع هذه الطريقة مع الباحثين المدربين تعطى نتائج ممتازة في الحصول على مستعمرات مفردة يمكن عزلها من مزارع نقية ، وتجرى بإتباع الخطوات في الشكلين التاليين:

ويخطط سطح البيئة بعد تصلبها بطبق بعد نزع غطاءه وذلك بلمس حلقة الإبرة بسطح البيئة بخفة ثم يرسم خطوط مستقيمة متصلة من أحد جوانب الطبق إلى الجانب الآخر مع مراعاة السرعة وعدم تجرح سطح البيئة ثم يغلق الطبق مباشرة كما بالشكل المجاور.

ب – التخطيط البسيط المتكرر:

وتجرى هذه الطريقة بتخطيط الطبق ابتداء من رقم 1 ثم رقم 2 ثم من رقم 3 كما في الشكل المجاور.

ج – طريقة التخطيط الرباعي:

أ – يفرد اللقاح في الإبرة ذات الحلقة بسرعة في منطقة صغيرة بجوار حافة الطبق (على سطح البيئة المتصلبة وتعرف بالمنطقة رقم 1 ويراعى عدم خدش سطح الآجار ثم يغلق الطبق مباشرة.

ب – تعقم الإبرة ثم تترك ليبرد لمدة 5 ثوان وخطط بها أربع خطوط متوازية تبدأ من المنطقة رقم 1 ومنتهية بالمنطقة رقم 2 ثم يقفل الطبق مباشرة.

ج – تعقم الإبرة مرة أخرى ثم تترك لتبرد 5 ثوان وتجرى 5 خطوط متوازية مبتدأ من المنطقة 2 إلى المنطقة 3 ثم يقفل الطبق مباشرة.

د – تعقم الإبرة وتترك لتبرد 5 ثوان وخطط بها أكبر عدد ممكن من الخطوط بادئاً من المنطقة رقم 3 إلى المنطقة رقم 4 كما في الشكل السابق.

هـ - عقم الإبرة قبل تركها.

د – طريقة التخطيط الشعاعي:

ا – يفرد اللقاح في الإبرة ذات الحلقة بسرعة في منطقة محدودة على سطح الآجار بجوار حافة الطبق ويغلق الطبق فوراً وتعرف بالمنطقة 1.

ب – تعقم الإبرة وتترك لتبرد 5 ثوان.

ج – من حافة المنطقة 1 يجري من 7 إلى 8 خطوط في اتجاه الحافة الأخرى من طبق خطوط غير متوازية ويقفل الطبق فوراً.

د – عقم الإبرة ثم اتركها تبرد 5 ثوان ثم تجرى عدة تخطيطات متعامدة مع الخطوط السابقة وموازية لبعضها ويقفل الطبق فوراً كما في الشكل السابق.

هـ - عقم الإبرة قبل تركها على حاملها

توضع الأطباق السابق تلقيحها بالطرق الخمسة سابقة الذكر بالحاضنة وهي في وضع مقلوب على درجة حرارة 37 5م لمدة 48 ساعة والوضع المقلوب يسمح للرطوبة التي قد تتكون على السطح الداخلي لغطاء الطبق ألا تتساقط على سطح البيئة (المزرعة. (

هـ - طريقة الصب في الأطباق:

في هذه الطريقة يجرى تخفيف ما تحمله حلقة إبرة التلقيح من المزرعة المختلطة(المكونة من 3 أنواع) في 3 أنابيب مسالة في الآجار المغذى بحيث تلقح كل أنبوبة من التي تليها حتى يكون بالثالثة كمية من الخلايا تكفي لإعطاء مستعمرات فردية ومن مميزات هذه الطريقة أنها لا تحتاج إلى مهارة أو مران سابق للحصول على نتائج جيدة كما في الشكل المجاور.

المضادات الحيوية

مضادات الحياة Antibiotics

هي مواد كيميائية عضوية تنتجها الكائنات الدقيقة (خاصة الفطريات)، وتقوم بقتل كائنات دقيقة أخرى مثل البكتيريا.

لها أهمية في علاج الأمراض الميكروبية Infectious Diseases، حيث تستعمل كنوع من المواد الكيماوية الطبيعية العلاجية Natural Chemotherapeutic agents

تقسم آلية عمل مضادات الحياة في البكتيريا إلى قسمين

موقفة لنمو الجراثيم Bacteriostatic (مثل مضاد: الايريثرومايسين)

قاتلة للجراثيم Bactericidal (مثل مضاد: البنسيلين)

- تستخدم طريقة Kirby-Bauer لتحديد درجة حساسية مختلف أنواع البكتيريا لمضادات الحياة العديدة، وبالتالي تساعد في اختيار نوع المضاد المناسب للعلاج.

تقسيم مضادات الحياة حسب طريقة تأثيرها على البكتيريا Mode of Action:

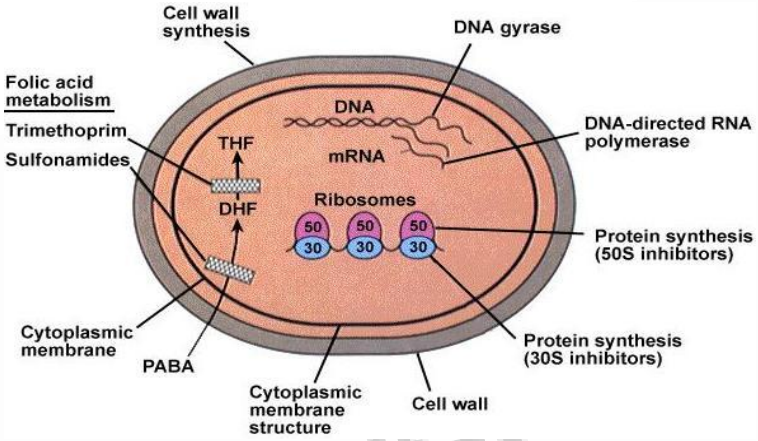
مضادات تؤثر على تكوين الجدار الخلوي Cell wall مثل مضاد - Penicillin (P) Bacitracin ((Ba) – Vancomycin (Va

مضادات تثبيط بناء البروتين داخل الخلية Protein مثل Erythromycin (E) - Gentamycin ((GN

مضادات تثبيط بناء الأحماض النووية DNA/RNA مثل Rifampicin (RF) – Ciprofloxacin ((CIP

مضادات تؤثر على خاصية النفاذية الاختيارية selective permeability للغشاء الخلوي مثل المضاد Polymyxins

مضادات تؤثر على بعض العمليات الايضية مثل sulphamethoxazole/trimethoprin (SXT)



مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية Antibiotic Resistance::

تعتبر من أهم الصعوبات التي تجابه الطبيب في معالجة الأمراض

لقد ثبت أنه لايوجد مضاد إلا وتوجد هذه الظاهرة

معدلات المقاومة تختلف من مضاد لآخر ومن كائن دقيق لأخر

وسائل مقاومة البكتيريا لمضادات الحياة:

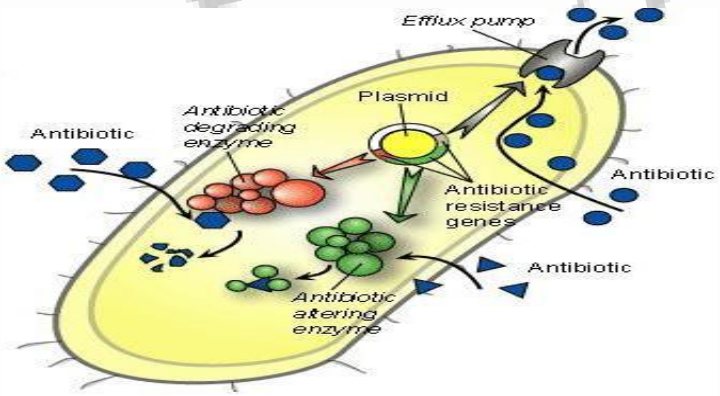
من الطرق التي يمكن للبكتيريا أن تقاوم الفعل الضار لمضادات الحياة:

1) بعض أنواع البكتيريا تنتج أنزيمات تكسر المضاد وتوقف فعاليته مثل أنزيم Penicillinase

2) بعض البكتيريا تفرز أنزيمات تغير التركيب الكيميائي للمضاد

3) تغير النفاذية الغشائية لخلايا البكتيريا مما يعيق دخول المضاد

4) تغير البكتيريا طبيعة بعض مكوناتها التي يستهدفها المضاد



أسس مقاومة البكتيريا لمضادات الحياة

المقاومة الطبيعيةIntrinsic Resistance

المقاومة بواسطة الطفرات Resistance by Mutations

المقاومة بواسطة البلازميدات Resistance by Plasmids

بعض الصفات الواجب توافرها في مضادات الحياة:

1) يجب أن لا تحدث تأثيرات جانبية Side effect بجسم العائل، مثل: الحساسية.

2) أن لا تقضي على الميكروفلورا الطبيعية للعائل.

3) أن لا تكون قادرة على انتخاب سلالات مقاومة .

اسم التجربة: اختبار حساسية البكتيريا لمضادات الحياة Bacterial Susceptibility test to Antibiotics

طريقة العمل:

1- تحضر أطباق بتري تحتوي على بيئة الاجار المغذي او اجار مولر هنتون Mueller Hinton agar

2- يحضر معلق للمزرعة البكتيرية النقية حديثة العمر بواسطة ابرة التلقيح المعقمة يؤخذ مقدار من المزرعة ويوضع في انبوبة تحتوي على 5 مل ماء معقم للحصول تركيز مكافي لمقياس 0.5 McFarland وترج الانبوبة 108CFU/ml

3- يلقح سطح الطبق من المعلق البكتيري السابق بواسطة Cotton swab

4- توضع أقراص المضادات الحيوية على أبعاد متساوية على سطح الطبق الملقح بالمزرعة البكتيرية بواسطة ملقط معقم بالتلهيب الكحولي

5- تحضن الأطباق مقلوبة عند 37م لمدة 24 ساعة

6- لاحظي مناطق التثبيط Inhibition Zones حول الأقراص ثم يقاس قطرها بالمسطرة لتعيين المضاد الأكثر فاعلية ضد البكتيريا المستخدمة

انعدام فعالية المضاد على البكتيريا يعني ان البكتيريا مقاومة (غير حساسة) للمضاد Resistant وتكون البكتيريا حساسة Sensitive في حال تأثرها بالمضاد

المختبر الثامن عشر

عزل الاحياء المجهرية من اللحوم

يعد اللحم وسط غذائي مثالي للعديد من المايكروبات لارتفاع نسبة الرطوبة فيه واحتوائه على مركبات نتروجينية وكاربوهيدراتية ومعادن واملاح بكميات مناسبة.كما ان ال pH ملائم لنمو الاحياء التي تسبب احداث تغييرات حيوية غير مرغوبة في اللحم. وفي الحالة الطبيعيةتحوي اللحوم عددا من الاحياء المجهرية .الفلورا المايكروبية متكونة اساسا من البكتيريا:

Pseudomonas,Lactobacillus,Bacillus,Leuconostoc, Micrococcus.

1- اللحوم الطازجة الحمراء

تخزن الطاقة في عضلة الحيوان على شكل كلايكوجين واثناء الذبح يتحول الى حامض اللاكتيك فينخفض ال pH من 7.5 اثناء الذبح الى (6-7.5) بعد 4-6 ساعات ثم 5.5 بعد 24 ساعة . هذا الانخفاض في pH اللحم يمنع حدوث هجوم مايكروبي يسبب الفساد.هذا العامل يقل في حالة اثارة الحيوان قبل الذبح بسبب استهلاك الكلايكوجين فتقل كمية الحامض المنتج فيبقى اللحم متعادل مما يزيد احتمالية تعرضه للفساد.

- مصادر تلوث اللحوم
  1 - التربة والماء واهواء وادوات الذبح والتقطيع.
  2 - ايدي وملابس العاملين في تجهيز اللحوم.
  3 - النقل والتسويق.

- الاختبارات التي تجري على اللحوم

1- Total Bacterial count
2- Coliform Bacterial count
3- *Staphylococcus aureius* Bacterial count
4- *Salmonilla* Bacteria count
5- Molds and yeast count

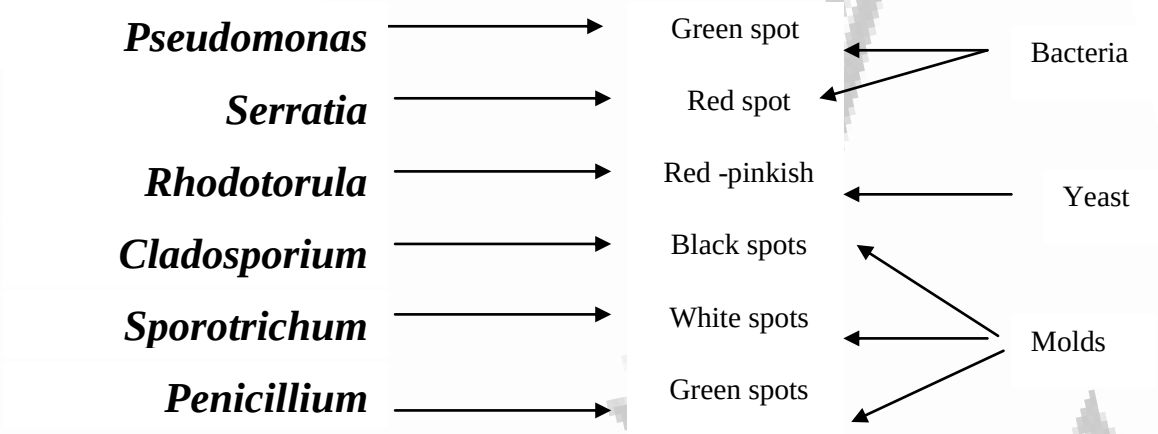
- أنواع التلف الميكروبي :

A) رائحة ومواد لزجة off- oder and slime

اول علامات تلف اللحوم هي ظهور رائحة يتبعها تكون مواد لزجة على السطح ، المسبب الرئيسي هو *Pseudomonas* .

B) تغير لون اللحم Discoloration

تظهر بقع ملونة على سطح اللحم نتيجة لنشاط الاحياء المجهرية التالية:



c) التعفن والتزنخ Putrification & Rancidity

يحدث التعفن نتيجة لنشاط الاحياء المجهرية تحت ظروف لاهوائية وانتاج انزيم Protease محللة البروتين الى NH3 و H2S وغيرها من المركبات العفنة.
أما التزنخ فيحدث نتيجة تحلل دهن اللحم الى Fatty acids و Glycerol فيعطي الرائحة الزنخة وفي كلا الحالتين البكتيريا المسئولة هي *Pseudomonas*.

D) تحمض اللحم Meat souring

يحدث عند خزن اللحم في درجة حرارة الغرفة اذ تنشط البكتيريا وسطية الحرارة (Mesophiles) مثل بكتيريا القولون (Coliform) و *Lactobacillus* هذه البكتيريا تؤكسد المواد السكرية في اللحم الى احماض عضوية .

<u>2- اللحم المفروم:</u>

تحتوي على اعداد كبيرة من الاحياء المجهرية نتيجة تعرض مساحة سطحية اكبر منه الى التلوث حيث تسهم الات فرم اللحم في التلوث إضافة الى خلط الأجزاء الملوثة مع غير الملوثة كذلك فان اضافة التوابل والخضروات الملوثة يضيف أعداد اخرى من الاحياء المجهرية مثل Lactobcillus, Micrococcus, Coliform,Streptococcus, Yeast.

4 - <u>لحم السمك</u>

تعتبر الاسماك اسرع تلفا من اللحوم الحمراء وذلك بسبب:
1) ارتفاع نسبة الرطوبة 2) ارتفاع pH
3) ليونة الانسجة وتفككها 4) دهن السمك اسرع تاكسدا من دهن اللحم الاحمر
5) احتوا الجلد و الحراشف والخياشيم والاحشاء على اعداد كبيرة من الاحياء المجهرية التي تفسد السمك بعد موته بفترة وجيزة.

الفلورا الطبيعية هي نفس الفلورا للمياه المتواجدة فيها ، ففي البحار والمحيطات

توجد : *Pseudomonas, Achromobacter, Vibrio, Flavobacterium*
اما الانهار فتحوي اضافة الى ما سبق: *Clostridium, E.coli, Lactobacillus, Bacillus*
بسبب وجود المواد العضوية وانخفاض الملوحة. وفي المياه الملوثة توجد انواع من *Clostridium* و *Vibrio* المسببة للتسمم الغذائي ، ولغرض الحفاظ على الاسماك من التلف يجب تبريدها واضافة الملح او الاحماض لخفض ال pH .

5- لحوم الدواجن

ان البيئة التي تعيش فيها الدواجن مليئة بالأحياء المجهرية المتنوعة وعليه فان الفلورا الطبيعية متنوعة ايضا مثل اجناس من : *Staphyllococcus, Streptococcus, E.coli, Pseudomonas, Clostredium, Lactobacillus, Salmonilla* .

واخطر هذه الانواع هي *Salmonilla* المسببة للتسممات الغذائية ومصدرها الحقل وما يحويه من مياه وعلف وفضلات .

المواد وطريقة العمل:

1 - تحضر سلسلة تخافيف لعينات اللحم الاحمر والمفروم بأخذ شرائح رقيقة من اللحم باستخدام ملقط معقم ويوزن 10 غم من عدة اماكن وتمزج في الخلاط مع 99 مل من ماء الببتون الى ان يتجانس المحلول وتعمل التخافيف 10^{-3} _ 10^{-6} .
2 - يحضر محلول متجانس من جلد السمكة وامعائها واحشائها بنفس الطريقة.
3 - يحضر محلول متجانس من جلد الدجاج وامعائه واحشائه بنفس الطريقة.

الاختبارات

1 - التعداد الحي العام للبكتيريا Total viable count

ينقل 0.1 مل من التخفيف الاخير الى الطبق ويصب فوقه الوسط الزرعي المناسب ويحضن وتعد المستعمرات .

2 - تعداد بكتيريا القولون

ينقل 0.1 مل من التخفيف الاخير الى الطبق ويصب فوقه الوسط الزرعي MacConky agar ويحضن لمدة 24 ساعة وتعد المستعمرات .

3 - التحري عن بكتيريا *Salmonilla*

يضاف 1 غم من عينة الدواجن الى 9 مل من وسط Selenite broth او Tetrathionate broth (اوساط اغنائية تحوي اليود كمثبط للاحياء الاخرى) تحضن في 37 م لمدة 72 ساعة ثم يخطط على وسط Brillient green agar او وسط Bismoth sulphate agar وتحضن بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة.

تلاحظ مستعمرات السالمونيلا على وسط Brillient وردية شفافة محاطة بهالة حمراء براقة . اما على وسط Bismoth فمركزها اسود وحافاتها شفافة.

4 -تعداد بكتيريا *Staphylococcus*

يستخدم وسط (Staph 110 (Nutrient agar+7.5 NaCl ، ويمكن استخدام وسط المانيتول في حالة عدم توفر الاول.

5 -تعداد بكتيريا *Lactobacillus*: بأستخدام وسط Rogosa .

6 -التعداد الكلي المباشر بطريقة Bread

يؤخذ سلايد ويرسم عليه مربع طول ضلعه 1 سم ويوضع عليه مقدار loop full من التخفيف الاول ويثبت ويصبغ ب Crystal violate ويغسل ثم يفحص وتعد الخلايا في 10 مجالات fields وطبق القانون التالي :

عدد الخلايا /مل = (عدد الخلايا في 10 مجالاتx5000x100xمعكوس التخفيف)/10

حيث:
(100 تمثل حجم Loopfull 0.01 مل)،(5000 رقم قياسي ثابت يمثل عدد الحقول في مربع طول ضلعه 1 سم)

Dr. RAHEM ALZIADI كلية التربية للعلوم الصرفة

Name:

Date:

Laboratory Report

Mark:

Results

Test	cfu		Microscopic feature
	-/+	No.	
Total viable count			
Coliform bacteria count			
Staph. aureius B.C			
Salmonilla B.C			
Molds and yeast count			

س1/ ما الفرق بين الفلورا المايكروبية الموجودة على اللحم و تلك الملوثة له ؟

س2/ ما هي خطورة وجود بكتيريا *staph. aureus* و *salmonella* في اللحم ؟

س3/ هل تتوقع ظهور جميع الانواع البكتيرية المذكورة في المختبر على احد الاوساط المستعملة في التجربة؟ لماذا؟

س4/ لماذا توجد بكتيريا *Flavobacterium* و *Achromobacter* في لحم السمك ول اتوجد في اللحم الاحمر؟

يكون التسمم الغذائي على نوعين:

1- **التسمم الناتج عن السم الخارجي Exotoxins**: ويسمى Food intoxication ،تفرز البكتيريا السم في الغذاء وليس ضروريا ان تكون البكتيريا حية حيث يمكن ان يكون العد الحي (Total viable count) لها يساوي صفرا او قد يكون عاليا كما يحدث في التسمم الغنقودي *Staphylococcus aureus* والتسمم البوتيليني (Botulism) الذي تسببه *Clostridium botulinum*.

2- **التسمم الناتج عن وجود الاحياء المجهرية في الغذاء:** إذ يتلوث الغذاء ببكتيريا التسمم وعند التهامها مع الغذاء تفرز سمومها داخل الامعاء (Endotoxin) ويسمى هذا النوع من التسمم Food infection كما في حالة التسمم بفعل :

Bacillus cereus **(**Bacillosis**)** **,** *E.coli, Salmonella***(**Salmonellosis**)** **,** *Shigella* **(**Shigellosis**)** **,** *Vibrio paraheamolytius* **(**Vibriosis**).**

الخطوات المتبعة في التشخيص والعزل:

1. تكثير البكتيريا باستعمال وسط اغنائي.
2. عزل البكتيريا على وسط اختياري وتفاضلي.
3. تنقية البكتيريا المعزولة.
4. اجراء الفحوصات البايوكيميائية.
5. اجراء الفحوصات المصلية.

اهم انواع النسممات الغذائية الشائعة :

1- *Salmonella* (Salmonellosis):

تسبب السالمونيلا العديد من الامراض كالتايفوئيد كما تسبب التسمم الغذائي ، هذا النوع من التسمم يتطلب دخول البكتيريا مع الغذاء (لاسيما لحوم الدواجن) لكي يحدث التسمم أي انها (Food infection) والبكتيريا تتحلل داخل الامعاء لتحرر السم الداخلي (Endotoxin). بكتيريا السالمونيلا هي عصيات سالبة لصبغة كرام ،متحركة باسواط محيطية. تعتبر الاعلاف ومياه الشرب في حقول الدواجن مصادر مهمة للتلوث ثم ينتقل منها الانسان.

طريقة العمل

1- تضاف عينة الغذاء الى الاوساط الاغنائية مثل Selenite broth و Tetrathionate broth .
2- يحضن المزروع بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة بالنسبة للوسط الاول و72 ساعة بالنسبة للوسط الثاني.
3- يخطط من الوسط الاغنائي على الاوساط الاختيارية:
XLD (Xylose - Lysine Deoxycholate) او Salmonella Shigella Agar او Brilliant Green Agar او Bismuth Sulfite Agar.
4- تحضن الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24-48 ساعة وتفحص المستعمرات أذ تظهر كالاتي:

- على وسط XLD : شفافة ذات مركز اسود.
- على وسط BSA : سوداء مع لمعان معدني او ذات مركز اسود مع حافات عديمة اللون.
- على وسط BGA: وردية حمراء او عديمة اللون محاطة بطبقة حمراء براقة.
- على وسط SS agar: شفافة ذات مركز اسود غير ملونة او وردية باهتة.

5- ينقل من المستعمرات وتجرى لها فحوصات مصلية (Stereotyping).

2- *Staphylococcus aureus*:

نوع التسمم الذي تسببة هذه البكتيريا هو Food intoxication إذ يجب ان يكون نوع الغذاء مناسب لنمو وتكاثر البكتيريا باعداد كبيرة لافراز السموم وهي سموم معوية Enterotoxins تفرز البكتيريا هذه السموم خارج خلاياها الى الغذاء Exotoxins.

لهذه البكتيريا القابلية على النمو في الاغذية المخللة والمملحة على الرغم من ان افراز السم يثبط بوجود تراكيز معينة من الملح، لكن ذلك قد يعتمد على طبيعة مكونات الغذاء نفسه اذ وجدت حالات افراز السم في اغذية تحوي تراكيز عالية من الملح.

مصدر هذه البكتيريا هو الانسان لما يحمله على يديه وجلده من بثور ودمامل ومن السعال والعطاس لكونها تعيش في تجاويف الفم. تفرز البكتيريا خمسة انواع من السموم الخارجية هي : A , B ,C ,D ,E, ويعتبر النوعان A و B اشد سمية للانسان، وتقاوم كل المعاملات التصنيعية للاجبان من حموضة وتمليح وجميع هذه السموم تذوب في الماء وتقاوم التحلل بانزيمات المعدة وجميعها مقاومة للمعاملات الحرارية التي تصل الى درجة الغليان.

طريقة العمل :

1- تحضر تخافيف عشرية من الغذاء وينقل (0.1 مل) من كل تخفيف الى طبق يحوي وسط اختياري هو Staph 110 او وسط Mannitol salt agar (البكتيريا مخمرة للمانيتول فتظهر المستعمرات صفراء ذهبية).

2- يعمل للمستعمرات التي تنطبق عليها صفات المكورات الذهبية اختبار تخثر البلازما Coagulation test وهي موجبة لهذا الاختبار.

3- اختبار انتاج الانزيم المقاوم للحرارة Deoxyribonuclease.

3- *Bacillus cereus*:

ان التسمم الغذائي هنا يعود لوجود اعداد كبيرة من هذه البكتيريا تصل الى (10^7) خلية /مل ، وعليه عند اختبار الغذاء الذي نتوقع انه مسبب للتسمم فليس من الضروري استعمال وسط اختياري. ويمكن عمل تعداد للبكتيريا الهوائية المحللة للدهون الفوسفاتية A.P.L.P (Aerobic Phosphlipase Producer) اذ يلقح وسط Egg Yolk Agar،ثم يتم اجراء فحص مجهري تأكيدي للعصيات الموجبة لصبغة كرام وفحوصات بايوكيميائية لهذه البكتيريا.

تسبب *Bacillus cereus* التسممات الغذائية خاصة في الاغذية النشوية المطبوخة في المطاعم كالرز والبطاطا عند تركها لساعات عديدة في جو المطبخ الحار، اذ تنمو سبورات البكتيريا التي تمتاز بانها ذات مقاومة عالية للحرارة ولا تقضي عليها عمليات الطبخ (سبورات هذه البكتيريا منتشرة في التربة وغالبا مصدرها الاغذية ذات الاصل النباتي والطحين والنشأ والمعكروني) كما تحلل هذه

البكتيريا الاغذية البروتينية وتنتج انزيمات الرنين المخثرة للحليب الخام.سموم هذه البكتيريا عبارة عن انزيمات مثل Heamolysin و Lecithinase وسموم اخرى لاتزال غير معروفة يطلق عليها Lethal toxins ،تتحطم هذه السموم عند درجة 60 م لمدة 30 دقيقة.

تمتاز هذه البكتيريا بعدة صفات ،فهي عصيات موجبة لصبغة كرام ، مكونة للسبورات، تنمو في مدى واسع من درجات الحرارة (10-48م) ومدى واسع من ال pH (5-9) ، مستعمراتها كبيرة على الاوساط الزرعية، تحلل الدم والنشأ والكازائين والجيلاتين وليس لها القدرة على استهلاك سكر الكلوكوز لاهوائيا ولا تستهلك المانيتول والزايلوز .

طريقة العمل

1- تعمل عدة تخافيف من العينة وينقل (0.1 مل) من التخفيف الملائم الى اطباق تحوي وسط MEPP (Mannitol Egg Yolk Phenol Red Polymyxin Agar) .
2- تحضن الاطباق بدرجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة.
3- تفحص المستعمرات اذ تظهر حافة المستعمرة خشنة حمراء بنفسجية مع ترسبات بيضاء كثيفة لان البكتيريا لا تستغل المانيتول وتحلل صفار البيض لافرازها انزيم Lecithinase.
4- تفحص البكتيريا مجهريا ويلاحظ السبور المتطاول Ellipsoidal داخل الخلايا البكتيرية.