جامعة تكريت

كلية الزراعة

مبادئ الأحياء المجهرية

Microbiology

الجزء العملي

إعداد

أ.د. عبد الكريم عريبي سبع

أ.م. شيماء عبد محمد

التعريف بالمادة :

تعريف الطالب بالاحياء المجهرية وبالاجهزة والادوات التي تستخدم في مختبرات الاحياء المجهرية وبالاوساط الزرعية وكيفية تنمية الاحياء المجهرية والتعامل معها في المختبر وكيفية تشخيصها وطرائق عدها وطرائق عزلها في مزارع نقية ، ودراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائيةوالكيميائية على الاحياء المجهرية .

الهدف من المادة :

تعريف الطالب بالكائنات الحية التي لاترى بالعين المجردة (البكتريا ، الفطريات ، الفايروسات ، الطحالب ، البروتوزوا) وطرق انتشارها وتواجدها في الطبيعة والتعرف على بعض آثارها الضارة والنافعة بالنسبة للانسان والحيوان والنبات.

مفردات المنهاج:

الاسبوع	المفردات
الاسبوع الاول	ارشادات عامة للعمل في مختبرات الأحياء المجهري واحتياطات السلامة
الاسبوع الثاني	الأجهزة والأدوات المختبرية
الاسبوع الثالث	التعقيم
الاسبوع الرابع	البيئات الزرعية
الاسبوع الخامس	امتحان الشهر الاول
الاسبوع السادس	عزل الأحياء الدقيقة من بيئاتها الطبيعية
الاسبوع السابع	التشخيص المظهري(الصفات المزرعية لمستعمرات البكتيريا)
الاسبوع الثامن	الفحص المجهري فحص حركة البكتيريا Motility of Bacteria
الاسبوع التاسع	- تحضير المسحة البكتيرية - تصبيغ البكتريا بصبغة كرام
الاسبوع العاشر	امتحان الشهر الثاني
الاسبوع الحادي عشر	طرق عد الاحياء المجهرية
الاسبوع الثاني عشر	عزل البكتريا في مزارع نقية

المختبر الاول Laboratory (1) :

ارشادات عامة للعمل في مختبر الأحياء المجهرية واحتياطات السلامة

يعتبر مختبر الأحياء الدقيقة(الميكروبات)المختبر الرئيسي في جميع المؤسسات الطبية والصحية سواء كانت تعليمية أو بحثية وعلاجية.

بعض التوجيهات الهامة لضمان السلامة وتحقيق الهدف بأقل قدر من الخسائر وأعلى قدر من الجودة ، و نود هنا أن نؤكد بصفة خاصة على الآتي:

1. يجب اعتبار كل عينة تصل إلي المختبر،معدية والتعامل معها علي هذا الأساس.
2. يجب اعتبار وجود خطر كامن في جميع المواد الكيميائية، ويجب التعامل معها حسب توصيات الصانعين.
3. يجب الالتزام باستعمال الملابس والاقنعه الواقية وإتباع توجيهات وإرشادات ذوي الخبرة في مختبرك.
4. يجب عدم الأكل والشرب داخل المختبر أو وضع مأكولات أو مشروبات في مبردات المختبر.
5. يجب عدم استخدام الفم أو لمس العينين أثناء العمل داخل المختبر.
6. تكتب المعلومات على الأطباق والأنابيب بطريقه مثالية(على الطبق وليس على الغطاء).
7. إتباع الأسلوب السليم في التخلص من أي مواد(حيوية أو كيميائية).
8. ارتداء الصدرية .
9. عدم اصطحاب الأدوات الشخصية والحقائب النسائية إلي المختبر حرصا على عدم تلوثها.
10. عدم لمس أو تحريك أي جهاز أو مستنبت أو أي من أدوات المختبر إلا بعد التعرف عليها وشرح طريقة وكيفية استخدامها بواسطة المشرف.
11. يجب تنظيف وتطهير مكان إجراء التجارب المعملية بمطهر قبل وبعد إجراء التجارب.
12. في حالة تلوث مكان العمل أو انسكاب أي ماده ،يجب أخطار المشرف فوراً.

13. غسل اليدين جيداً بالماء والصابون ومسحها بالمطهر قبل مغادرة المختبر.

كيفية التعامل مع المزارع البكترية (culture Handling Procedures)

1- قبل ابتداء وبعد انتهاء فترة كل درس عملي يجب مسح طاولة العمل بالمادة المطهرة.

2- عدم وضع المزارع البكترية (Bacterial Cultures) الأوساط الزراعية Inoculated Media على الطاولة العمل مباشرة بل وضعها في الحوامل أو السلال (Baskets) أو أي وعاء آخر مخصص لهذا الغرض.

3- احرق إبرة التلقيح (Loop) أو الإبرة الناقلة (Needle) قبل وبعد كل استعمال.

4- ضع المواد الملوثة (Contaminated Material) والمزارع القديمة (Old Cultures) وبنتائج العمل الذي أنهيته في الأوعية المخصصة لذلك.

5- يجب عدم استعمال الفم عند استعمال الماصات (Pipettes) لنقل المزارع الميكروبية وفي حالة عدم توفر الماصات الميكانيكية يستحسن وضع كمية من القطن في النهاية العريضة للماصة قبل تعقيمها.

ملاحظات حول كتابة تقارير مختبر البكتريولوجي(Laboratory Reports)

1- عنوان التجربة.

2- الهدف من إجراء التجربة.

3- طريقة العمل وحين إجراء أي تعديل قد تطرأ حسب الظروف المتوفرة وعدا ذلك يشار إلى اسم التجربة فقط.

4- النتائج ويجب أن تذكر تلك التي يحصل عليها الطالب كما هي وان كانت غير مشجعه وينظم جدول بها إذا تطلب الأمر.

5- المناقشة وفيها يحاول الطالب مناقشة نتائجه مع زملائه لمعرفة قربها أو بعدها عن المتوقع مع ذكر الأسباب المؤدية لذلك من خلال المعلومات العملية والنظرية التي اكتسبها.

المختبر الثاني Lab. (2) :

الاجهزة والادوات المستخدمة (Instruments and Tools Used)

أ)الاجهزة:

1) المجهر The microscope :

هو جهاز يستخدم لتكبير الاجسام المتناهية في الصغر التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة او لإظهار التفاصيل الدقيقة للأشياء من اجل اكتشاف تكوينها ودراستها . وكلمة "مجهرية" او "مجهري" تستخدم لوصف الاشياء التي لا يمكن رؤيته الا بمساعدة المجهر .

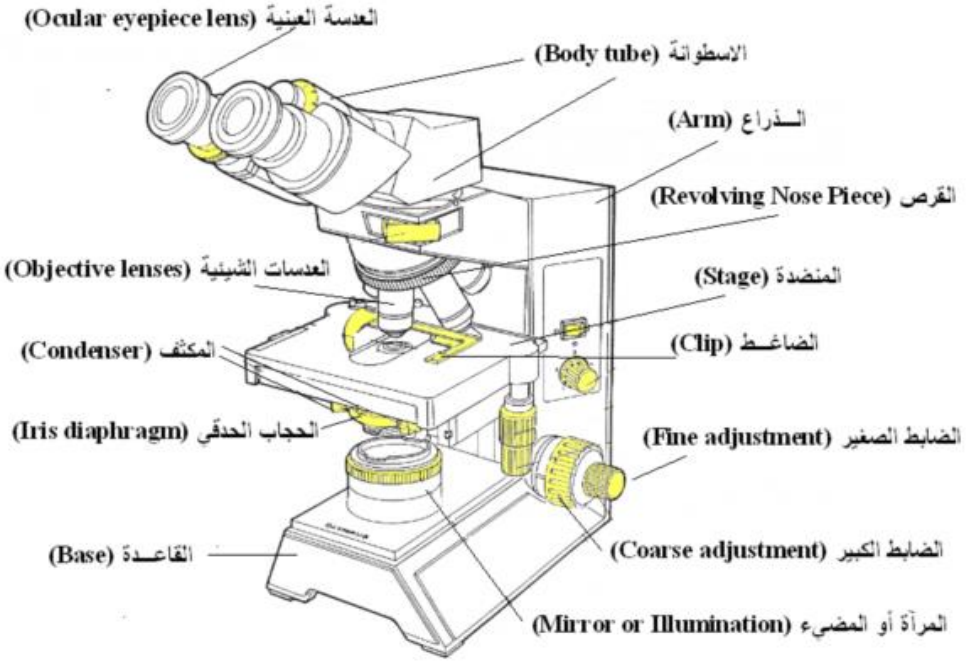
ومن المجهر ما هو بسيط (عبارة عن عدسة مكبرة واحدة وبفضلها نحصل على صورة مكبرة للجسم). اما المركبة (المعقدة) فتتكون من عدد كبير من العدسات .

انواع المجاهر :

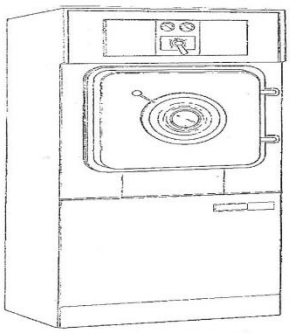
من انواع المجاهر

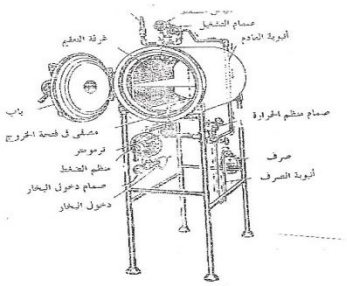
1- **المجهر الضوئي (Light microscope) :** وفيه تستخدم اشعة الضوء العادي والعدسات المستخدمة فيه من النوع الزجاجي وتصل قوة التكبير في هذا النوع من المجاهر الى 1000 مرة .

2- **المجهر الالكتروني (Electron microscope) :** وفيه تستخدم الاشعة الالكترونية والعدسات المستخدمة فيه عدسات مغناطيسية وتصل قوة التكبير فيه الى 200000 مرة .



2) جهـــاز المؤصـــدة : (Autoclave)


أوتوكلاف حديث


أوتوكلاف قديم

يستخدم هذا الجهاز في تعقيم السوائل والاوساط الزرعية باستخدام درجة حرارة تصل الى 121مْ وضغط 15 باوند /انج^2 أي مايعادل 1 جو لمدة تتراوح من (10 – 20) دقيقة اذ نستخدم مدة 10 دقائق مع الاوساط الزرعية السكرية و15 دقيقة مع الاوساط الزرعية الاخرى و20 دقيقة عند اتلاف الاوساط الزرعية الحاوية على نمو ميكروبي .

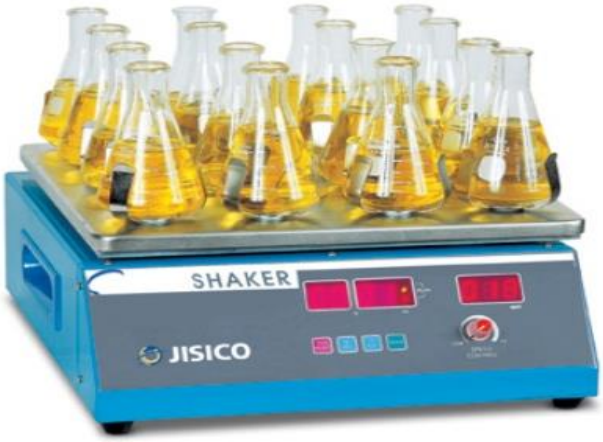
حضان

3)الحاضنة (Incubators) : وهذه تستخدم لأنماء الكائنات الحية المجهرية وتزويدها بدرجة الحرارة الملائمة والمناسبة للنمو .

4) الفرن (Oven): يستخدم لتعقيم الادوات الزجاجية والمعدنية وتكون درجة الحرارة المستخدمة هي 160 ْم لمدة ساعتين او 180 ْم لمدة ساعة ونصف .

5) الثلاجات (Refrigerator): تستخدم لحفظ المواد الكيميائية والمزارع الميكروبية اذ تحفظ فيها الاوساط الزرعية المزروعة وذلك من خلال ايقاف نمو الاحياء المجهرية وتثبيطها.

6) جهاز رج واهتزاز(Shaker).



7) موازين مختلفة (Balances).

8) حمامات ماء(Water Baths).

9) جهاز لقياس الرقم الهيدروجيني(PH Meter).

10) جهاز قياس شدة الضوء(Spectrophotometer).

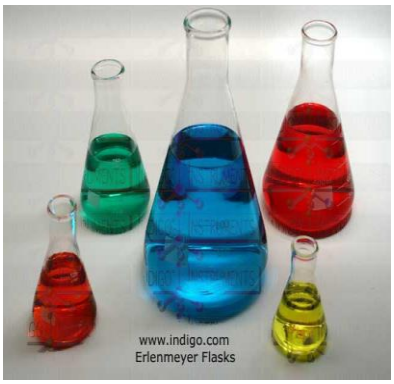
11) جهاز طرد مركزي(Centrifuge).

12) جهاز تقطير الماء (Water distillation).

13) غرفة لعزل الكائنات الحية الدقيقة(Isolation cabinet).

ب) الادوات الزجاجية(Glass Wares)

1- اوانـي زجاجيـة(Glass Wares): مثـل الـدوارق (Conical Flasks) والكـؤوس الزجاجية(Beakers) والـدوارق الزجاجيـة الحجميـة (Volumetric Flasks) ومخـابير مدرجـة (Measuring Cylinders) وسـحاحات(Burettes) وانابيـب اختبـار(Test tubes) وماصات مختلفة الاحجام (Pipetts).



2- اطباق بتري (Petri dishes) : تستخدم لصب الاوساط الزرعية الصلبة وقد تكون مصنوعة من الزجاج او البلاستك.

3- شرائح زجاجية (Slides) واغطية شرائح (Cover Slips).

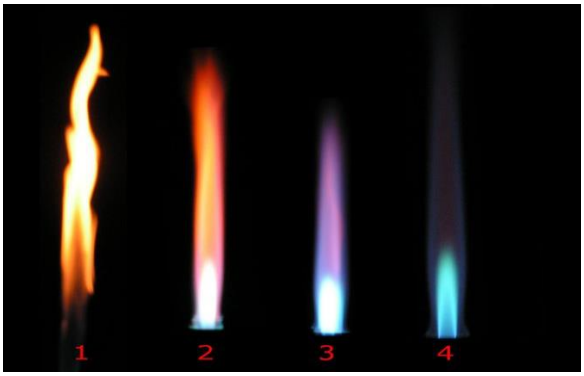
4- ابرة تلقيح (Inoculation needles) : تستخدم لنقل الخلايا الميكروبية من وسط الى آخر وتستخدم كذلك للطعن ويتم تعقيمها على اللهب .

5- ناقل (loop) : يستخدم لنقل الخلايا الميكروبية من وسط الى آخر ويتم تعقيمها باللهب .

4- الناشر (Spreader) : اداة زجاجية على شكل حرف (L) تستخدم لنشر الخلايا الميكروبية على سطح الوسط الزرعي ويتم تعقيمه قبل وبعد كل استخدام بغمره بالكحول ثم يمرر على اللهب .

5- الممسحة القطنية (Swab) : أداة تتكون من عصا خشبية وفي نهايتها قطن تستخدم لمسح الخلايا الميكروبية على سطح الوسط الزرعي وتستخدم لمرة واحدة ويتم التخلص منها برميها في المطهر.

6- مصباح بنزن (Benzen flame): ويستخدم لتعقيم الابر والنواقل وفوهات الانابيب .



7- ملاقط (Forceps) مختلفة الاحجام ومقصات (Scissors).

8- اجهزة قياس درجات الحرارة(Thermometers).

9- حوامل انابيب اختبار معدنية وخشبية وقناني غسيل(Washing bottles) وصوان (Trays) مختلفة الاحجام.

10- اقلام شمعية(Wax pens)واوراق لاصقة(Label Papers).

11- ادوات تشريح(Dissection tools).

المختبر الثالث: Lab. (3) :

التعقيم

Sterilization

تعريفه:

إزالة أو إبادة لجميع الميكروبات الموجودة في صورتها الخضرية أو في صورتها الساكنة (سبورات ، اجسام الحجرية وغيرها) من الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة في إبعادها أو إحجامها وعادة يتم التعقيم باتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائيه أو كيميائيه أو ميكانيكيه .

- الطرق الفيزيائية physical methods:

تعتبر الحراره المرتفعة وكذالك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التي تستعمل في أغراض التعقيم . غير إن التعقيم الحراري هو أكثر أنواع التعقيم شيوعا.

***أولا: الحرارة:** وتقسم الى :

أ) الحرارة الجافة Dry heat sterilization

1- اللهب المباشر Incineration heat

ويستخدم في ذالك لهب نصباح بنزن مثلا لتعقيم إبرة التلقيح ، وكذالك الشرائح الزجاجية وفوهة الأنابيب وفوهة الدورق .

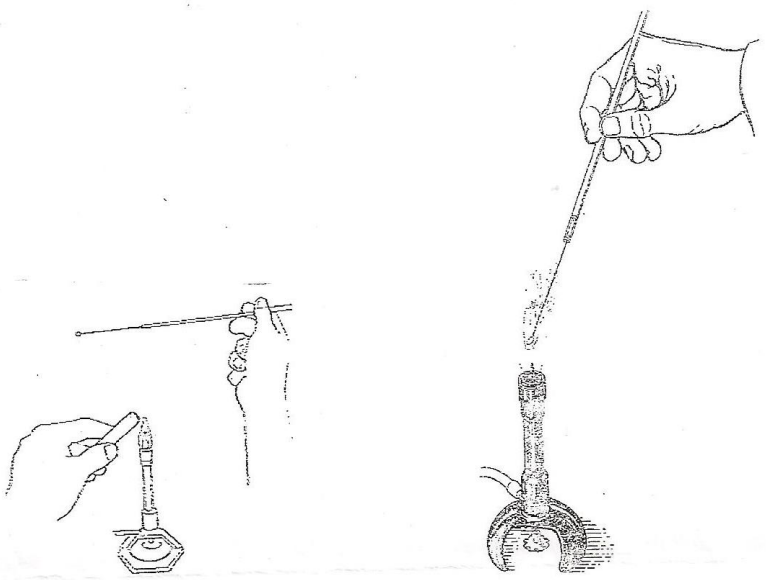
2- أفران الهواء الساخن hot air oven

ويستعمل في تعقيم الأواني الزجاجية ، أطباق بتري ، الماصات وذلك بعد وضعه في اسطوانة معدنيه خاصة بكل منها ، وتوضع هذه الاسطوانات داخل المعقم على درجة حرارة 180 م لمدة ساعة ونصف أو 160 م لمدة ساعتين إذا أريد تعقيمها تعقيما كاملا، وبعد التعقيم يترك

المعقم بعض الوقت حتى يبرد ثم يفتح ونستخرج منه الأدوات حتى لا تبرد فجأة مما قد ينشأ احتمال كسرها وتلويثها .

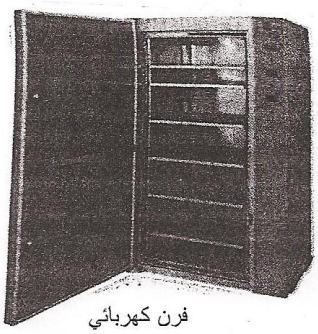
3- التلهيب الكحولي Alcohol flaming

يستخدم في تعقيم بعض الأدوات كالناشر ، المشرط ، الملقط ، المقص وذلك بغمرها الجسم المراد تعقيمه في كحول ايثيلي ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل ما يعلق به من كحول .



طريقة تعقيم إبرة البكتيريا طريقة تعقيم فوهة أنبوبة

إبرة تلقيح (بكتيريا) إبرة تلقيح (فطر)



فرن كهربائي

ب) الحرارة الرطبة Moist heat

ويقصد به استغلال بخار الماء في إجراء التعقيم بدلا من الهواء الساخن.

1- معقم "المؤصدة"التعقيم بالبخار تحت الضغط " Autoclave

وتعتبر هذه العملية أحسن وأسرع وسائل التعقيم لقدرة الحرارة الرطبة على الاختراق ، ومن ثم فهي تقتل الجراثيم ، وللقيام بهذا النوع يستعمل جهاز يسمى "المؤصدة" Autoclave"، وهو عبارة عن اسطوانة معدنية متينة لكي تتحمل الضغط وبداخلها يوضع الماء ثم توضع المواد والاجهزه المراد تعقيمها على أرفف خاصة ، ويوجد للجهاز غطاء خاص . ومن المعروف إن الماء يغلي عند 100م تحت الضغط الجوي العادي، وترتفع هذه الدرجة إذا ارتفع الضغط داخل الوعاء الذي يوجد به الماء اذ تصل درجة الحرارة الى 121ْم وضغط 15 باوند / انج^2 . وفيما يلي بيان بما يمكن تعقيمه في الاوتوكلاف :

* معظم البيئات المغذية التي تتحمل درجات الحرارة المرتفعة مثل بيئة الآجار المغذي .

*الشاش والقماش والقطن وسدادات الكاوتش.

* المزارع الميكروبية المراد التخلص منها كمزارع البكتيريا المرضية . ويجري التعقيم في الاوتوكلاف لمدة 10 - 20 دقيقه على درجة حرارة 121 ْم تقريبا.

2- التعقيم المتقطع (التندلة) Tyndalization :

وفيها يستعمل العليان على درجة حرارة 100 ْم لمدة 30 دقيقة 3 مرات والفترة بينهما يوم كامل ، اذ تقتل الخلايا الخضرية بالحرارة في اليوم الاول وتبقى السبورات المقاومة للحرارة وعندما تنخفض درجة الحرارة تنمو الخلايا الخضرية من السبورات وتقتل في اليوم الثاني عند الغليان اما في اليوم الثالث للغليان فلغرض التأكد من موت كل الخلايا الخضرية في حالة بقاء السبورات في نهاية غليان اليوم الثاني وتستعمل هذه الطريقة مع المواد التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية عند استخدام جهاز المؤصدة مثل البيئات والاوساط السكرية .

3- البسترة Pasteurization :

وهذه لاتعد وسيلة تعقيم 100% وتتم بالتسخين الى درجة حرارة من (63 – 65)ْم لمدة نصف ساعة او 72 ْم لمدة 15 ثانية وبهذه الطريقة سوف تقتل البكتريا المسببة للاجهاض وحمة مالطا Brucella الموجودة في الحليب وكذلك تقتل الخلايا الخضرية للبكتريا غيرالمكونة للسبورات والموجودة في الحليب دون التأثير على نكهة وقوام الحليب .

ثانيا :الإشعاعات radiations

يستفاد عمليا من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على الميكروبات في تعقيم بعض الأماكن كغرف العمليات الجراحية وعنابر تعبئة الأدوية و العقاقير المعقمة وغرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتيريولوجية الكبيرة وفي بعض الصناعات الغذائية و صناعة الألبان و في تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة ومحطات الحجر الزراعي لتطهير المنتجات الزراعية ومن الاشعة المستخدمة :

1. الأشعة فوق البنفسجية ultravoilt radiation

تستعمل عادة هذة الأشعة أكثر من غيرها من أغراض التعقيم وفي الأغراض السابق ذكرها ويلاحظ أن الأشعة فوق البنفسجية لها قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء من ذلك نرى أن فعلها التعقيمي سطحيا و قد ينحصر تأثيرها على الخلية الميكروبية .

2. الإشعاعات الأخرى

يمكن استعمال الأشعة السينية x-ray ذات الموجات القصيرة وكذلك أشعة جاما في أغراض التعقيم وهذة الإشعاعات لها قدرة على إختراق الأجسام الصلبة و التغلغل فيها ولكنها تتطلب أجهزة خاصة ذات تكاليف عالية .

ثالثا:الطرق الكيميائية chemical methods

من المواد الكيميائية التي تستخدم في صورة محاليل للتعقيم السطحي

ت) الكلوروفورم: تعتبر من المطهرات الطيارة وتستخدم في تعقيم بعض المواد مثل سيرم الدم ويتم التخلص منه بتسخينه على حمام مائي على 75م كي يتطاير

ث) الفينول أو حمض الكربوليك :

قد تستعمل بعض المواد مثل الفينول بتركيز 5% للتعقيم السطحي لأرضيات الغرف والعيادات و بعض الأدوات والأجهزة

ج) كلوريد الزئبقيك :

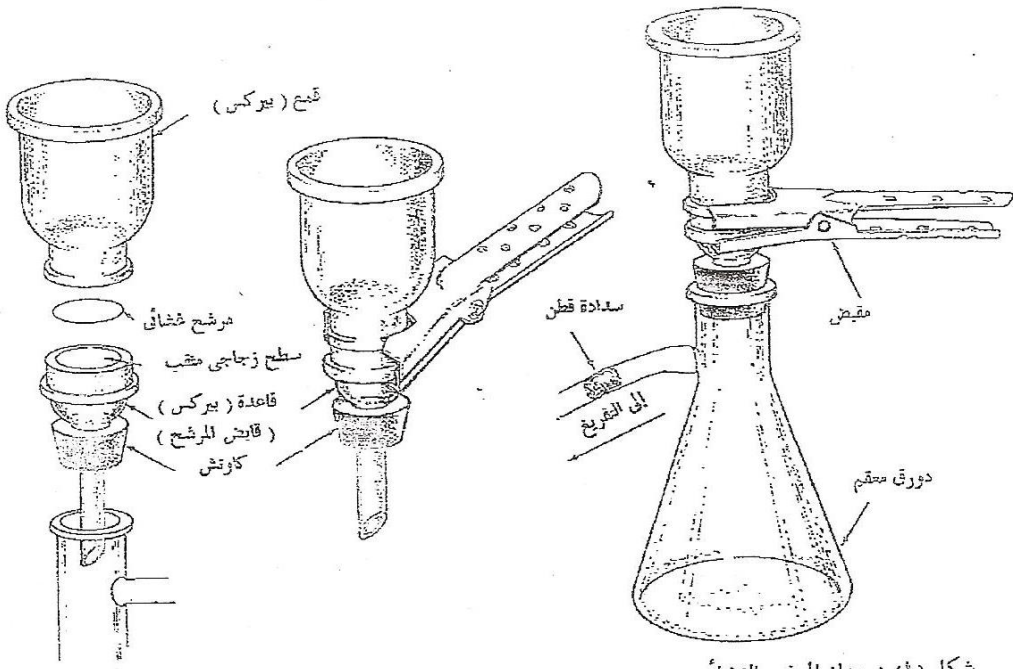
يستخدم بتركيز 0.001لتعقيم الأيدي و المناضد ودرنات البطاطس أي تستخدم لتعقيم الأسطح الخارجية للنباتات

ح) كحول الإثيل :

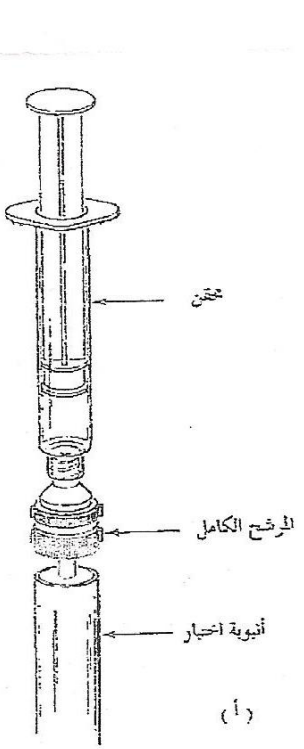
يستخدم بتركيز من 50-70% في تطهير الأيدي أو المناطق المختلفة في الجسم و يرجع تأثيرها المميت إلى تجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوي .

رابعا:الطرق الميكانيكية mechanical methods

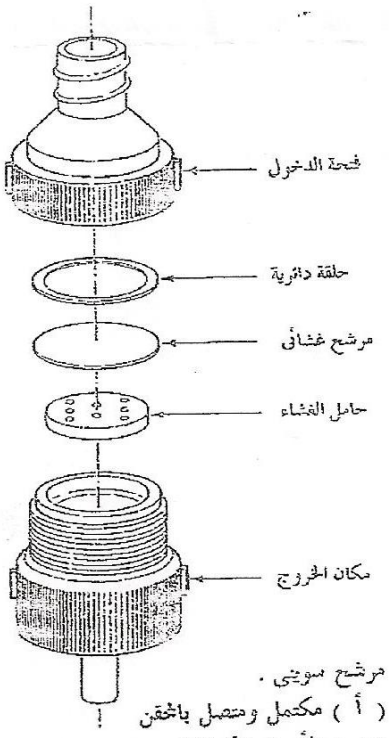
تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كأن تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الأقطار التي تزيد عن أقطار ثقوبها . و تستعمل المرشحات في تعقيم بعض المواد التي لايمكن تعقيمها عن طريق الحرارة الرطبة بنوعيها حيث أن الحرارة المرتفعة تغير من الخواص الكيميائية و الفيزيائية لهذة المواد مثل التحضيرات الإنزيمية ومحاليل المضادات الحيوية .



شكل (أ) : جهاز المرشح الغشائي .



(أ)



(ب)

مرشح سوينى .
(أ) مكتمل ومتصل بالخزان
(ب) الأجزاء المكونة له .

Lab. (4) :

البيئـات الزرعية

CULTUR MEDIA

إن غالبية الدراسات والبحوث البكتريولوجيه تتطلب استعمال بيئات زرع مختلفة تحضر بالمعمل، وهذه البيئات وإن لم تكن متماثلة تماماً مع البيئات التي تعيش فيها أو عليها هذه الكائنات في الطبيعة إلا أنها قريبة الشبه منها قرباً قد يوفر الاحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازم لتنميتها. لذا يمكن تعريف **البيئة الزرعية** بأنها أوساط زراعية مناسبة لنمو الأحياء المجهرية تتوفر فيها متطلبات النمو الأساسية، أو أي مادة يمكن أن تنمو عليها الكائنات الدقيقة.

تنمى الاحياء المجهرية لعدة اغراض مثلا لحفظها واكثارها ودراسة خواصها وتشجيع نموها للانتاج الصناعي وتختلف الاوساط الزرعية بالنسبة لمكوناتها وقوامها ويعتمد اختيار الوسط الزرعي على :

1- طبيعة ونوع الاحياء المجهرية المراد تنميتها .
2- الغرض الذي من اجله يزرع كائن مجهري معين .

تصنف البيئـات الزرعية من ناحية التركيب إلى ..

1- بيئات مصنعة (محددة التركيب الكيميائي) Syntific media :

وهي التي تتكون من مواد ذات تركيب كيماوي محدد "بتركيزات معروفة"، ونظراً لأن التركيب الكيماوي لكل مكونات البيئة التركيبية يكون معروفاً ومحدداً، فإنه يمكن تكرار تجهيز مثل هذه البيئات بنفس الدقة في كل مرةٍ من مرات التحضير ومن الامثلة على ذلك Nutient agar و Potato dextrose agar .

2- بيئات طبيعية (غير محددة التركيب الكيمياوي) Natural media:

هي التي تحتوي على مايلزم نمو الميكروبات من مواد بشكلها الخام، مثل البيئـات التي يدخل في تركيبها المواد الطبيعية كمستخلص اللحم، الدم، أو مستخلص الأنسجة النباتية، ولما كان التركيب الكيماوي الدقيق لمثل هذه المواد غير محدد بمعنى أن جميع مكونات

البيئة وكمياتها غير معروفة بالضبط وتختلف باختلاف المادة الطبيعية المستعملة كان من الصعب تكرار تحضيرها عملياً.

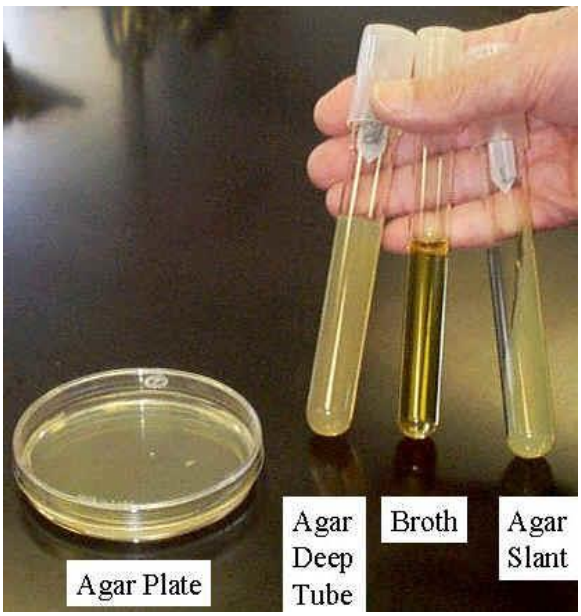
3- بيئات نصف مصنعة Semi synthetic media :

وهي الاوساط التي تحضر من مواد كيميائية محددة وبتراكيز معروفة ثم يضاف اليها مواد طبيعية كالدم والبيض وغيرها ومن امثلة ذلك Blood agar .

ويمكن تقسيمها على أساس قوامها إلى:

1- بيئات صلبة Solid media :

مثل البيئات التي يدخل في تركيبها الآجار أو الجيلاتين، وتستخدم لتمييز المستعمرات.



4- بيئات نصف صلبة Semisolid media :

وهي التي تحتوي على كمية من الآجار لا تزيد عن ربع الكمية التي تضاف إلى البيئات الصلبة القابلة للإسالة.

5- بيئات سائلة Liquid media :

مثل بيئة اللبن أو بيئة المرق المغذي، وتستخدم لتنمية الميكروبات المعزولة بصورة نقية.

بالإضافة إلى ذلك توجد بيئات ذات أغراض خاصة لسهولة تنمية وعزل مجموعات معينة من البكتيريا مثل:

1- الأوساط الغنية Enriched media :

وهي أوساط عادية بسيطة مضافاً إليها مواد غذائية غنية مثل الدم، المصل، مستخلصات النباتات أو الحيوانات لمواجهة متطلبات النمو الصعب الإرضاء مثل

Serum agar – Milk agar – Blood agar

2- الأوساط الاختيارية Selective media :

وهي الاوساط التي تضاف لها بعض المواد بتركيز معين كالصبغات، أملاح الصفراء، المضادات الحيوية، الأحماض للسماح بنمو مجموعة من البكتيريا دون غيرها كإضافة صبغة الكريستال البنفسجي بتركيز معين يؤدي إلى نمو مختلف أنواع البكتيريا السالبة لصبغة جرام ويمنع نمو البكتيريا الموجبة.

3- الأوساط المفرقة Deferential media :

هي الأوساط التي تسمح بنمو نوعين من البكتيريا يمكن التمييز بينهما، مثل بيئة آجار الدم فبإضافة الدم إلى الوسط الزراعي يسمح بتمييز البكتيريا المحللة للدم وغير المحللة، حيث تظهر حلقة فارغة حول المستعمرة المحللة، وبذا تلعب الأوساط المحتوية على الدم دور الوسيط الغني المفرق في الوقت ذاته.

4- بيئات التقدير الحيوي Biological assay media

5- بيئـات عد البكتيريا Media for eneumeration of bacteria

6- بيئـات التعرف على البكتيريا Media for characterization of bacteria

المكونـات الأساسية للأوسـاط الزرعية:

تشترك معظم الأوسـاط الزراعية في احتوائهـا على المواد التاليـة:

❖ الببتـون Peptone

يعتبـر مصـدراً هامـاً للنتـروجين العضـوي فـي البيئـات المعدة لتنميـة البكتيريـا غيـر ذاتيـة التغذيـة، يحضـر من اللحم الخالي من الدهون بعد تحلله بـإنزيم الببسين.

❖ خلاصـة اللحم Beef extract

تحضـر من اللحـم البقـري الخـالي من الدهـون بعد غليـه وترشيح الخلاصـة وتركيزهـا، يحتـوي المستخلص على بعض الأحمـاض غيـر العضويـة وبعض المواد العضويـة مثل الأحمـاض الأمينيـة، الجلوكـوز، اليوريـا، حـامض اللكتيـك، الفيتـامينـات، عوامـل النمـو الأخرى.

❖ خلاصة الخميـر Yeast extract

تحتوي على بعض الأحمـاض الأمينيـة، وبعض العوامـل المسـاعدة للنمو، وأملاح معدنيـة.

❖ المـاء Water

تحتـاج الخلايـا الحيـة إلى المـاء لنموهـا ولإتمـام عملياتهـا الأيضيـة، وعلاوة على استخدامه كمـادة مذيبـة للمـواد الغذائيـة، ويفضـل استخـدام المـاء المقطـر لخلوهـا مـن الأمـلاح المعدنيـة.

❖ المواد التصليبيـة Solidifying agents :

تضـاف إلـى بيئـة الـزرع السـائلة بعض المـواد لتسـاعدهـا علـى تحولهـا إلـى بيئـة صلبـة تسـاعد على تكويـن مستعمرات فرديـه.

وفيمـا يلي بعض المواد التصليبية التي تضـاف إلى بيئـات الزرع ..

❖ الجيلاتين Gelatin

أول ما استعمل كمادة تصليبية في بيئات الزرع، وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات، ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تصليبية في البيئة نظراً لأن كثير من البكتيريا يمكن تحليله مائياً، ولأنه ينصهر عند درجات التحضين.

❖ الآجار آجار Agar agar

مادة كربوهيدراتيه تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء، والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان، وهو يتصلب عند درجة حرارة من 42- 45م، ويمكن إسالته مرة ثانية عند درجة حرارة 98م، ويتميز عن الجيلاتين كونه لا يمكن تحليله بيولوجيا لأن عدد الكائنات المحللة له قليلة جداً.

تحضير الاوساط الزرعية :

1- وزن الوسط الزرعي المراد تحضيره ويعتمد هذا على ما مكتوب على علبة الوسط الجاهزة من الشركة المصنعة .

2- ضبط الاس الهيدروجيني (pH) للوسط .

3- تعقيم الوسط بجهاز المؤصدة لمدة زمنية تعتمد على الوسط المحضر .

4- صب الاوساط / في حالة الاوساط الزعية السائلة يحضر الوسط ويوضع في انابيب قبل التعقيم ، اما في حالة الاوساط الصلبة فبعد التعقيم تبرد الاوساط الى درجة حرارة 45 °م بحيث لايؤدي الى تصلبه ثم تصب اما في اطباق معقمة مسبقا ويترك ليتصلب ثم توضع الاطباق بشكل مقلوب في الحاضنة لتقليل التبخر كما انه يمنع تكثف الماء على السطح او / يصب الوسط الصلب في انابيب ويوضع بشكل مائل ليتصلب بعد فترة ويسمى Slant .

5- اختبار العتمة Sterility test :

العتمة : هو عدم وجود الاحياء المجهرية داخل الاوساط الزرعية المعقمة .

توضع الانابيب والاطباق والدوارق الحاوية على وسط معقم في الحاضنةقبل الاستعمال للتأكد من خلوه من التلوث ثم يوضع في الثلاجة او يستعمل مباشرة .

المختبر الخامس Lab. (5)

عزل الأحياء الدقيقة من بيئاتها الطبيعية :

الهدف: إثبات مباشر وواضح لانتشار الأحياء الدقيقة في الطبيعة.

طريقة العمل:

1- تعقم البنجات بالديتول ويتم تشغيل اللهب قبل العمل بحوالي 10 دقائق.

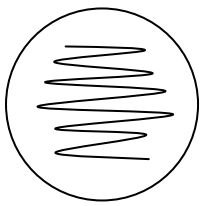
2- تدون المعلومات الخاصة بالمجموعة مثل:(مصدر العزل- رقم المجموعة – اسم المقرر- تاريخ العزل) في أسفل الأطباق المستخدمة في العزل.

3- يتم العزل من المصادر المختلفة كالآتي:

*الهواء (هواء المختبر-الهواء الخارجي) يعرض طبق الاجار المغذي المعقم للهواء بعد فتح الغطاء لمدة 30 دقيقة.

*البنج، التربة ، اللعاب.

باستخدام ممسحات قطنية معقمه swab امسح على سطح البنج ثم خطط على سطح الاجار أو لتلقيح المرق المغذي (بعد غمس القطنه بماء مقطر معقم).



*افتح الطبق بزاوية 45 ثم ادخل إصبعك وخططي بشكل حلزوني على سطح الاجار.

4- تحضن جميع الأطباق مقلوبة في درجة حرارة 25- 30 م لمدة 24 – 48 ساعة.

ثم بعد ذلك يتم رسم شكل المستعمرات إن أمكن لمعرفة:

- نوع الأحياء الدقيقة المتواجدة في كل بيئة.
- سيادة أحد هذه الأحياء على الآخر .

المصدر البيئي	النمو البكتيري			
	ممتاز	جيد	ضعيف	لا يوجد نمو
الهواء				
رذاذ العطاس				
الأسنان				
الإصبع				
الماء				
التربة				
البنش				
الأرضية				
مقارنة (كنترول)				

المختبر السادس Lab. (6)

التشخيص المظهري(الصفات المزرعية لمستعمرات البكتيريا):

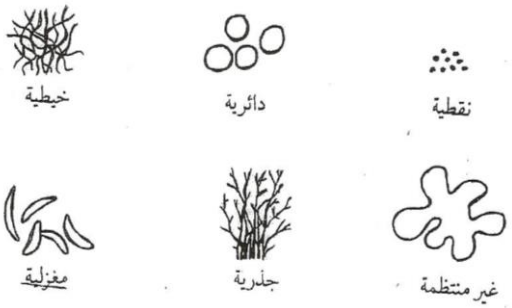
تشمل الصفات المزرعية للكائن البكتيري المظهر المرئي بالعين المجردة للنمو فوق أو في بيئات مختلفة . والهدف من دراسة الصفات المزرعية لمستعمرات البكتيريا هو التعرف على أنواع البكتيريا المختلفة وتشخيصها.

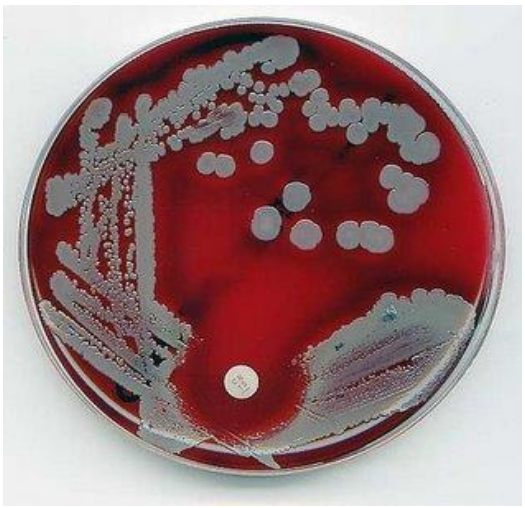
ويمكن تقسيم الصفات المزرعية للبكتيريا إلى:

أولا : الصفات المزرعية عند نمو البكتيريا على البيئات الصلبة

1. شكل المستعمرة

- نقطية
- دائرية
- خيطية
- غير منتظمة
- جذرية
- مغزلية



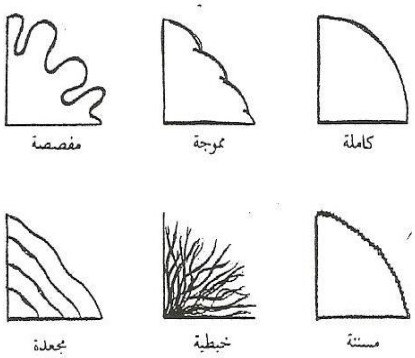


2. ارتفاع المستعمرة

- مسطحة
- مرتفعة
- محدبة
- كثيرة التحدب
- مرتفعة المركز

3. شكل حافة المستعمرة

- كاملة
- مموجة
- مفصصة
- مسننة
- مجعدة
- خيطية



4. سطح المستعمرة

- ناعم
- خشن

5. الصفات الضوئية للمستعمرة

- معتمة: لا تسمح للضوء بالمرور خلالها.
- نصف شفافة: تسمح للضوء بالمرور خلالها ولكن لا تسمح بالرؤية الكاملة للأشياء خلفها.

6. قوام المستعمرة

- زبديا
- لزجا
- غشائيا
- هشا

7. لون المستعمرة

(أ) تفرز بعض البكتيريا صبغات غير ذائبة في الماء تلون المستعمرات ولاتلون البيئة وقد تكون لون المستعمرات أصفر أو أحمر أو.....الخ ومن أمثلتها البكتيريا *Xanthomonas* التي تظهر مستعمراتها باللون الأصفر.

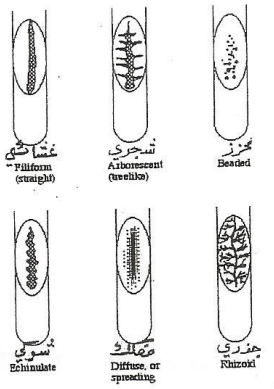
(ب) كما تفرز بعض البكتيريا الأخرى صبغات ذائبة في الماء تلون البيئة ولا تلون المستعمرات مثل بعض أنواع الجنس *Pseudomonas* *والتي تفرز صبغة فلوريسينية* ذائبة في الماء لونها أخر مصفر.

ثانيا: وصف النمو البكتيري على بيئة الأجار المغذي المائل

1. كمية النمو البكتيري

- ضئيل
- متوسط
- غزير

2. شكل النمو



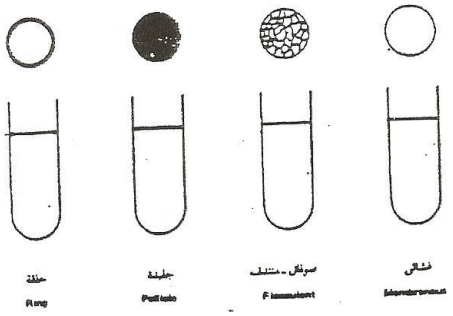
- محزز
- شجري
- غشائي
- جذري
- مفكك
- شوكي

3. الرائحة

أ- ليس له رائحة

ب- اذا وجدت رائحة يذكر مدى تشابهها لأي روائح معروفة

ثالثا: وصف النمو البكتيري في بيئة المرق المغذي



1. النمو على سطح المنبت

- لايوجد نمو سطحي
- حلقة محيطة بالسطح
- قشرة رقيقة تغطي السطح
- نمو سطحي متجمع (كتل بكتيرية ملتصقة ببعضها تطفو على السطح)
- نمو غشائي سميك

2. النمو تحت السطح

- لايوجد نمو
- عكر
- حبيبي

3. النمو المترسب

- لايوجد راسب
- راسب حبيبي
- راسب متكتل
- راسب لزج
- راسب قشري

المختبر السابع : Lab.(7):

الفحص المجهري للبكتريا

- تحضير المسحة البكتيرية The preparation of bacterial smear

ان التحضيرات المصبغة للخلايا المثبتة (Fixed) عموما تتيح للباحث دراسة الآتي :

1- فحص الخلايا بصورة دقيقة ، شكلها وكيفية انتظامها .
2- ملاحظة المكونات الخلوية الداخلية والخارجية .
3- التمييز بين الانواع الميكروبية المختلفة .

تستعمل عادة كمية صغيرة من النمو الميكروبي وتنشر على سطح شريحة زجاجية نظيفة وبعد ان تجف المسحة بالهواء تمرر على لهب ناري .ان هذه الخطوة لاتقتل البكتريا فقط بل تخثر المواد البروتينية للخلية المثبته بذلك الميكروب على الشريحة الزجاجية وبذلك يكون التحضير جاهزا لاستعمال المحاليل الصبغية .

يطلق على المواد الكيمياوية المستعملة عادة لتصبيغ البكتريا بالـ (Dyes) والتي تكون اما حامضية او قاعدية . ان الاصباغ الحامضية كصبغة Acid fuchsin تصبغ المكونات السايتوبلازمية للخلايا والتي هي قاعدية بطبيعتها اما الصبغات القاعدية كالـ Crystal violet و Methylene blue و Safranin فهي تتحد مع المكونات الخلوية ذات الطبيعة الحامضية .

ان هذه الطريق تساعد على رؤية الاشكال العامة وترتيب الخلايا اما التراكيب الداخلية كالسبورات او الكبسولات فلا تتصبغ عادة بهذه الطريقة .

- تصبيغ البكتريا بصبغة كرام Gram staining

تعد صبغة كرام من اهم واكثر الصبغات التفريقية شيوعا في المختبرات المايكروبايلوجية ، ان اهمية هذه الصبغة تكمن في فائدتها الكبرى من ناحية استعمالها في تشخيص البكتريا وخاصة ان هذه التقنية لا يمكن تطبيقها على اي من الاحياء المجهرية الاخرى كالابتدائيات او الفطريات عدا الخمائر فهي موجبة لصبغة كرام .

المواد المستعملة :

1- مزارع بكتيرية عمرها 24 ساعة .
2- المحاليل الصبغية :

- محلول Crystal violet (الصبغة الابتدائية) .

- محلول اليود Lugol's iodine (مثبت) .
- محلول Safranine (الصبغة المعادلة) .

3- شرائح زجاجية نظيفة .

أسباب استعمال المحاليل السابقة في آلية كرام :

أ) محلول البنفسج البلوري : الصبغة الابتدائية لتصبيغ الخلايا البكتيرية في الخطوة الاولى.

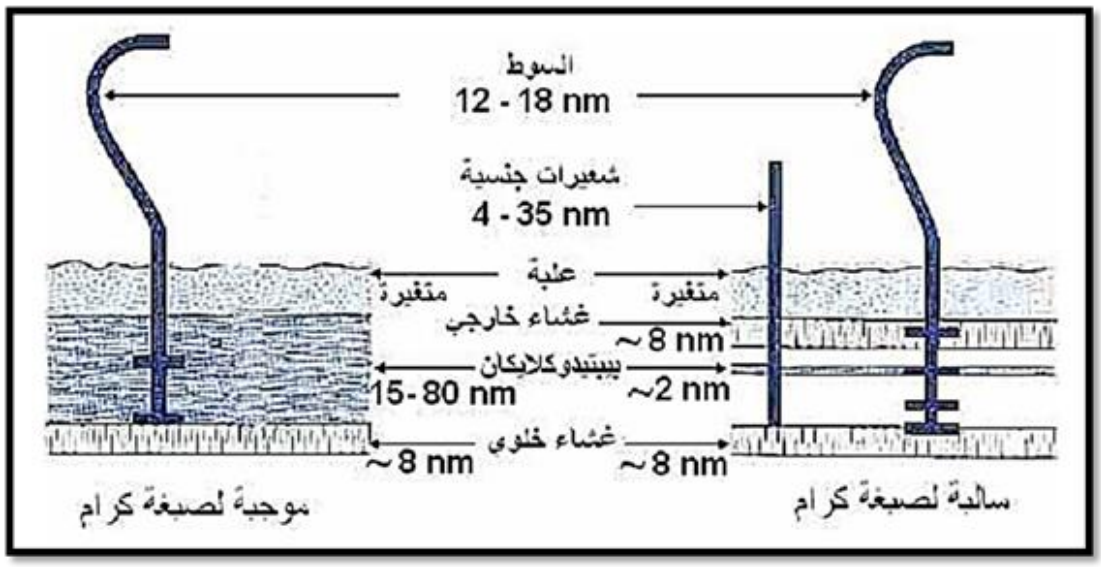
ب) محلول اليود : يستعمل كمثبت لصبغة البنفسج البلوري في الخلايا البكتيرية من خلال تكوينه معقد كيمياوي ضمن جدار البكتريا .

ت) الكحول الاثيلي 95% : يستعمل لازالة الصبغة من الخلايا السالبة لصبغة كرام ويجب ان يكون الوقت محدد في هذه الخطوة لانه اذا زادت الفترة يؤدي الى زوال الصبغة من الخلايا الموجبة لصبغة كرام .

ث) محلول السفرانين : الهدف من استخدامها هو تمكين الباحث من رؤية البكتريا التي اصبحت بدون لون عند معاملتها بالكحول .

نظرية تفسير آلية صبغة كرام :

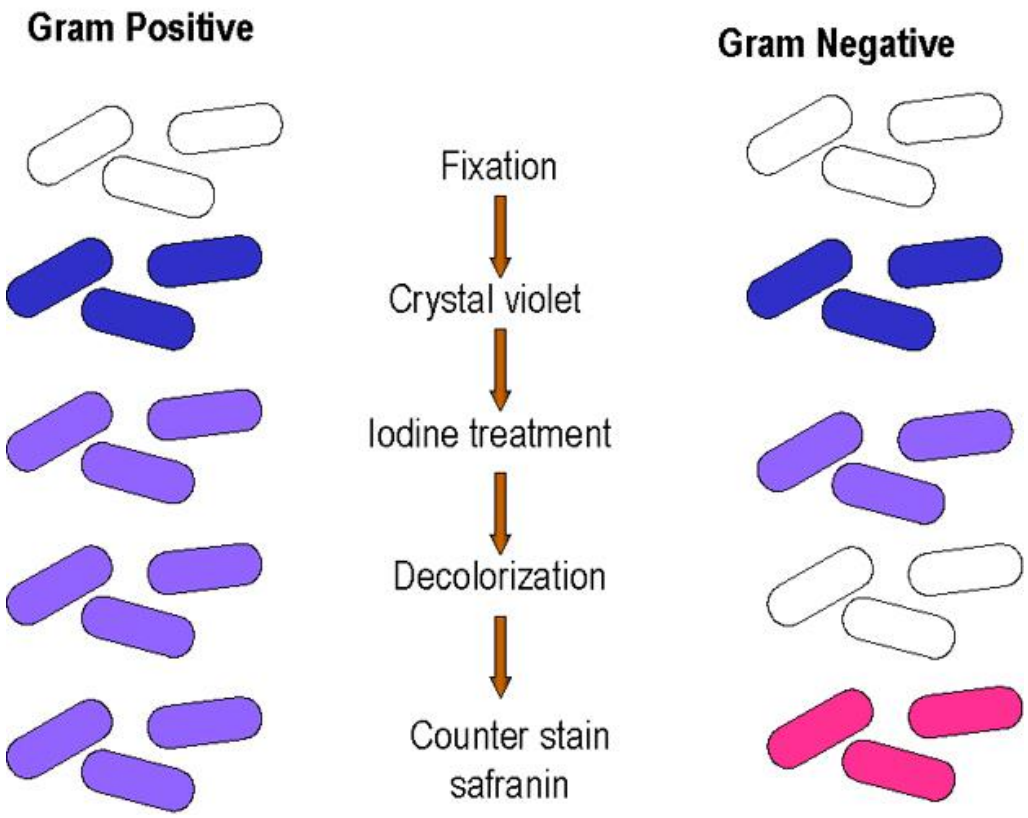
تؤكد هذه النظرية ان السبب في احتفاظ بعض البكتريا بصبغة Crystal violet وعدم احتفاظ البعض الآخر بها يعود الى ان Crystal violet واليود يكونان معقد كيمياوي ضمن جدار البكتريا ولوجود كمية من الدهن في جدار الخلية G^-ve لذا يعمل الكحول على اذابته فيسمح بخروج المعقد الناتج من الصبغة واليود ، اما بكتريا G^+ve فتكون نسبة الدهن قليلة في جدارها فضلا عن ان جدار البكتريا الموجبة لصبغة كرام يحتوي على كمية اكبر من الببتيدوكلايكان مما يجعل احتفاظها بالصبغة اكثر من بكتريا السالبة لصبغة كرام .



طريقة العمل :

1) حضر مسحات بكتيرية مثبتة .
2) ضع صبغة Crystal violet على المسحة البكتيرية بكمية وافرة لمدة نصف دقيقة .
3) اغسل الشريحة جيدا بالماء.
4) ضع محلول اليود لمدة نصف دقيقة .
5) اسكب محلول اليود (لاتغسل الشريحة).
6) ضع عدة قطرات من محلول مزيل الالوان لمدة 10 – 15 ثانية .
7) اغسل الشريحة جيدا بالماء الجاري .
8) ضع الصبغة المعادلة السفرانين لمدة نصف دقيقة .
9) اغسل الشريحة جيدا بالماء الجاري ثم اتركها لتجف او ضعها بين طبقتين من الورق النشاف الى ان تجف .
10) ضع قطرة زيت ثم افحص المسحة تحت المجهر .

ملاحظة : ان استعمال المحاليل الصبغية بصورة غير كافية من ناحية الكمية او الوقت المتاح ينتج عنه تصبيغ غير جيد وغير متساوي .



ان البكتريا التي تتصبغ بصبغة كرام تقع في احدى المجموعتين :

1- المجموعة الموجبة لصبغة كرام (Gram positive)

وهي التي تحافظ على الصبغة الابتدائية (البنفسج البلوري) فلذا يظهر لونها ازرق او بنفسجي .

2- المجموعة السالبة لصبغة كرام (Gram negative)

وهي التي تفقد الصبغة الابتدائية فلذا تتصبغ بالصبغة المعادلة (السفرانين) ويظهر لونها احمر .

المختبر الثامن : Lab.(8):

الفحص المجهري

فحص حركة البكتيريا Motility of Bacteria

تقسم البكتيريا من حيث قدرتها على الحركة إلى بكتيريا متحركة (motile) وغير متحركة (nonmotile) ونظرا لوجود أعضاء حركية للبكتيريا المتحركة والتي تسمى الأسواط (flagella) فإن هذه الأنواع البكتيرية تكون متحركة حركة حيوية (vital movement) أو تسمى حركة حقيقية، ويمكن دراسة هذه الأعضاء الحركية بواسطة تحضير القطرة المعلقة (Hanging Drop Preparation) والحركة الحيوية للبكتيريا حركة تقدمية منتظمة. أما الحركة البراونية للبكتيريا فهي حركة تذبذبية غير منتظمة للأمام والخلف تحدث لأي جسم سواء كان حيا أو ميتا.

*ملاحظة: يجب استخدام مزارع بكتيرية حديثة الزرع، لا يتجاوز عمرها 18 ساعة لأن البكتيريا تفقد قدرتها على الحركة بتقدم العمر.

(1) فحص حركة البكتيريا بواسطة القطرة المعلقة

طريقة العمل:

1- ينقل بابرة التلقيح Loop من المزرعة البكتيرية حديثة العمر نشطة النمو الى مركز غطاء شريحة نظيف.

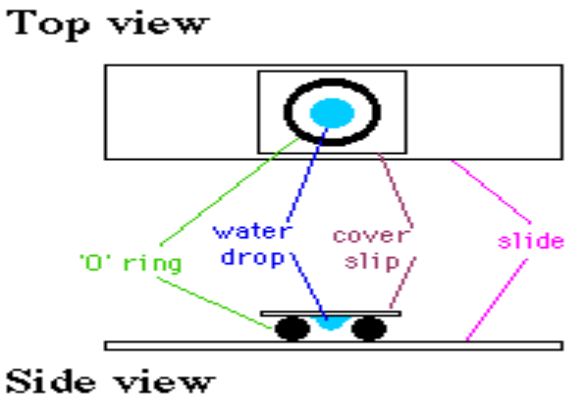
2- يوضع في اركان الغطاء نقط صغيرة من الفازلين.

3- توضع الشريحة المقعرة فوق الغطاء ثم تقلب الشريحة باحتراس بحيث تكون النقطة المعلقة في منتصف التقعير بدون ملامسة قاع الشريحة.

4- توضع الشريحة على المجهر ويتم الفحص عند حافة القطرة مع مراعاة تقليل الاضاءة.

5- يتم الفحص باستخدام العدسة الزيتية.

6- يوصف مع الرسم حركة وشكل وطريقة تجمع الخلايا مع بيان نوع الحركة.



(2) استخدام منابت نصف صلبة بواسطة الوخز:

باستخدام الحقن بالوخز في داخل الانابيب الزجاجية او استخدام الانابيب علي شكل حرف (U) يتم الحقن باستخدام مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة :

أ- في حالة الانابيب العادية :

يبدو النمو في مكان الوخز فقط و الانبوب رائق في حالة البكتيريا الغير متحركة اما في حالة البكتيريا المتحركة يتم تعكير الانبوب كلة مع ظهور مكان الوخز علي شكل شجرة مقلوبة

ب- في حالة الانبوبة على شكل حرف (U):

نلاحظ في حالة البكتيريا المتحركة نلاحظ تعكر الانبوب من مكان الوخز حتي الجانب الاخر له اما في البكتيريا الغير متحركة نجد النمو في مكان الوخز فقط و باقي الانبوب رائق

(3) استخدام المنابت النصف صلبة المصبوبة:

استخدام الاجار المغذي بنسبة 0.5% اجار و يتم الحقن في منتصف الطبق باستخدام الابرة ذات العقدة Loop بالبكتيريا المراد فحصها يتم تحضين الطبق عند 37 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة و يلاحظ ما يلي:

- في حالة البكتيريا الغير متحركة نجد النمو في مكان الحقن فقط و بارتفاع عن سطح الوسط المغذي

- في حالة البكتيريا المتحركة نجد ان النمو علي شكل تموجات متصلة في انحاء الطبق كله و هذا دليل علي ان هذه البكتيريا نشطة الحركة مثل بكتريا Proteus .

المختبر التاسع Lab.(9)

طرق عد البكتريا

يمكن تقدير وتحديد النمو البكتيري بعدة طرق اما مباشرة ويتم ذلك باستخدام المجهر الضوئي لفحص العينة او بطرق غير مباشرة ويكون ذلك بحساب عدد المستعمرات النامية على طبق زرعي صلب .

الطرق المباشرة:

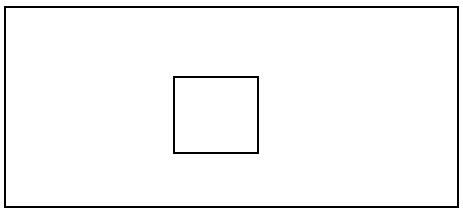
1. المسحة المصبغة Stained Smear :

اذ ينشر حجم معلوم 0.01 كم المعلق البكتيري على مساحة معينة (1سم^2) في الشريحة الزجاجية ثم يثبت ويصبغ ويفحص بالمجهر الضوئي وبما انه ليس من العملي حساب عدد الخلايا في المساحة فلا ننتخب عدد حقول مجهرية بصورة عشوائية ويحسب عدد الخلايا فيها كالاتي :

عدد البكتيريا /مل = عدد الحقول في 1سم^2 (5000)*معدل عدد الخلايا الموجودة في كل حقل *100*مقلوب التخفيف.

100=لتحويل القطرة من 0.01 مل الى 1مل.

وقد واجهت هذه الطريقة عدة انتقادات واهمها صعوبة نشر العينة بصورة متجانسة وقد استعيض بطرق افضل.



2.استعمال غرف العد Petroff –Hausser Counting –Chamber:

وهي عبارة عن شريحة زجاجية مقسمة بصورة دقيقة ومضبوطة الى مربعات مساحة كل منها $\frac{1}{400}$ ملم^2 ومغطاة بغطاء زجاجي يرتفع بمقدار $\frac{1}{50}$ ملم^2 عن الشريحة اذ ان الحجم في المربع الواحد سيكون مساويا الى $\frac{1}{20000}$ملم^3 يوضع المعلق البكتيري الغير مصبغ بحجم معلوم ومن ثم يفحص باستعمال المجهر وتحسب عدد الخلايا كالاتي :

عدد البكتيريا /مل = $\frac{\text{عدد البكتيريا المحسوبة في الحقول}}{\text{عدد الحقول}}$ *20000*مقلوب التخفيف

ان طريقة العد المباشر سهلة وسريعة وتحتاج الى القليل من الادوات ويمكن ملاحظة الشكل الخارجي للخلايا اثناء عملية العد كما يجب تخفيف المعلق الكثيف جدا ولا يمكن حساب عدد الخلايا في المعلق المخفف بدرجة كبيرة .

الطرق غير المباشرة

وتشمل حساب عدد الخلايا البكتيرية الحية فقط والموجودة في العينة الاصلية وتحسب عدد الخلايا بهذه الطريقة عن طريق الاطباق المزروعة ، ان هذه التقنية تعتمد اساسا على ان كل ميكروب ينمو ويتكاثر مكونا كتلة حية من البكتيريا (المستعمرة Colony) وبمعنى اخر ان الميكروب الواحد ينتج عنه مستعمرة واحدة يضاف الى ذلك الافتراض السائد بان المعلق البكتيري عادة متجانس ولا يحصل فيه تجمع للخلايا.

1. حساب عدد الخلايا البكتيرية عن طريق عد المستعمرات في الاطباق المزروعة The Plate Count Technqiue

تعتمد هذه التقنية على تخفيف العينة خلال سلسلة من الانابيب الحاوية على ماء معقم ومن ثم تستعمل سلسلة من الاطباق الحاوية على وسط زرعي صلب ،سيلاحظ تناقص اعداد المستعمرات الناتجة بسبب ملية التخفيف والذي سيساعد على الحصول على مستعمرات معزولة بصورة جيدة فلذلك فانه باستعمال هذه الطريقة يمكن الحصول على معلومات عن نوعية وكمية البكتيريا الموجودة في العينة الاصلية .

- طريقة الصب بالأطباق Pouring Plate method

الادوات والمواد المستعملة :

1.دورق زجاجي حاوي على العينة المراد فحصها.

2.ماء معقم وانابيب اختبار زجاجية ومعقمة .

3.ماصات سعة 1و 10 مل معقمة .

4.اوساط غذائية خاصة بتنمية المجاميع البكتيرية .

5.اطباق زجاجية معقمة .

خطوات العمل:

1. ينقل 1 مل من العينة الاصلية الى انبوبة رقم واحد والحاوية على 9 مل من الماء المعقم باستعمال ماصة معقمة ويرج المزيج جيدا ليتكون محلول متجانس ذا تركيز $\frac{1}{10}$

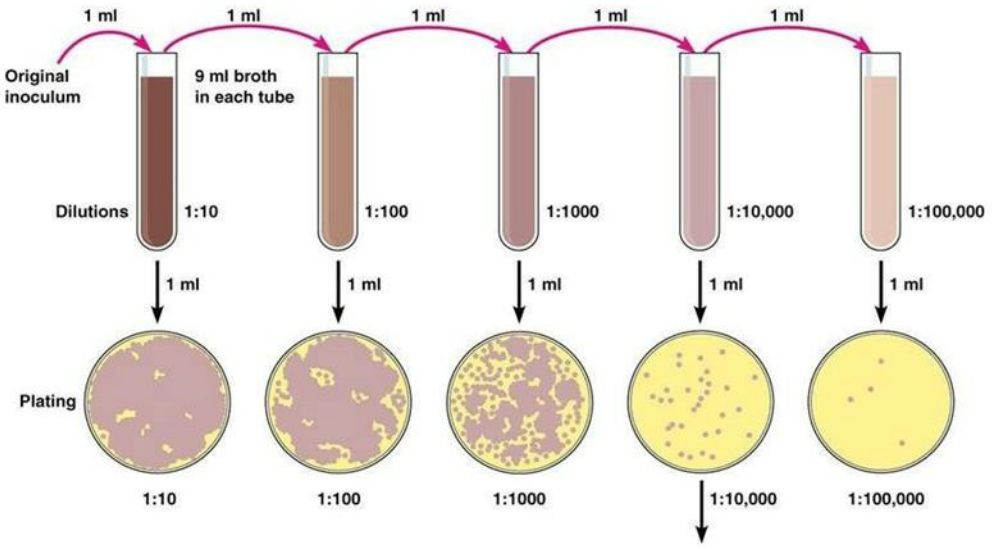
قانون التخفيف $=\frac{\text{الجزء}}{\text{الكل}}$

$10^{-1}=\frac{1}{10}=\frac{1}{9+1}=$

2. باستعمال ماصة معقمة ينقل 1 مل من القنينة 1 الى القنينة 2 مع رج المحول جيدا لنحصل على محلول متجانس ذات تركيز 10^{-2}

التخفيف $=\frac{(0.1)1}{1+9}=\frac{0.1}{10}=\frac{1}{100}=10^{-2}$

3. استمر بهذه العملية حتى تحصل على محاليل بتركيز $10^{-3},10^{-4},10^{-5},10^{-6}$ عملية الرج ضرورية لكل خطوة للحصول على محلول متجانس .



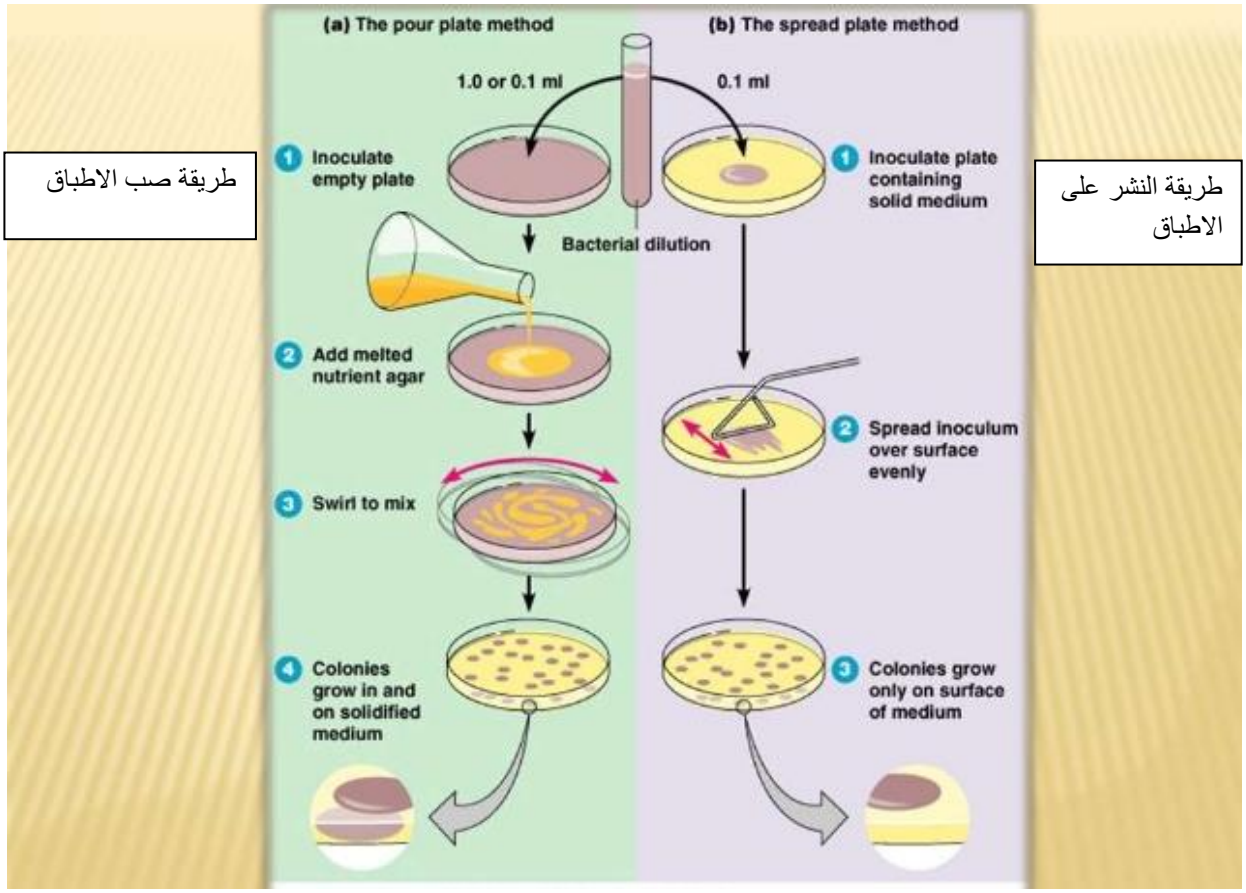
Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

4. لتقدير اعداد البكتيريا والفطريات انقل 1 مل من التخفيف $10^{-5},10^{-6}$ بعد رج الانابيب جيدا الى وسط طبق بتري واعمل ثلاث مكررات من كل تخفيف .
5. اسكب في كل طبق حوالي 15سم^3 من وسط غذائي ملائم ذائب بدرجة حرارة 45مْ مع مراعاة الشروط الصحيحة لتقليل التلوث ثم حرك الاطباق بشكل دائري على المنضدة خمسة مرات باتجاه عقارب الساعة وخمس مرات عكس اتجاه عقارب الساعة ومرتين الى الامام والى الخلف لكي تتوزع خلايا الاحياء المنقولة بصورة متجانسة مع الوسط الغذائي .
6. تترك الاطباق الى ان يتصلب الاكار ثم توضع في الحاضنة بصورة مقلوبة لمدة 24-48ساعة وبدرجة حرارة 37مْ.
7. نختار الاطباق التي يتراوح عدد المستعمرات فيها من 30-300مستعمرة . وفيما يلي مخطط لخطوات العمل .
8. تحسب عدد الخلايا البكتيرية كالاتي :

عدد البكتيريا / مل من العينة الاصلية =عدد المستعمرات في الطبق * مقلوب تخفيف العينة .

ب.طريقة النشر على الاطباق Spread Plate

في هذه الطريقة يحضر الوسط الصلب مسبقا ثم ينقل مقدار 0.1 مل من التخفيف المطلوب (لا ينصح باستخدام كمية اكثر بسبب صعوبة جفافها على سطح الوسط الزرعي) ثم ينشر على سطح الوسط بواسطة قضيب زجاجي يشبه الحرف(L) وبعد حضن الاطباق يمكن عد الاحياء المجهرية كما في الطريقة السابقة .



2. طريقة العد الاكثر احتمالا Most Probable Numbers (MPN)

كما في الطريقة السابقة يجب تحضير تخافيف عشرية وحتى التخفيف الذي ينعدم فيه تواجد البكتيريا او الفطريات ثم ينقل 1 مل او 0.1 مل من التخفيف المطلوب الى انابيب تحتوي وسط النمو الزرعي السائل (ثلاثة انابيب او خمسة ثمانية او عشرة) وتوجد جداول مقابل عدد الانابيب التي تستخدم لإخراج القيم منها . وكلما زاد عدد تكرار الانابيب كلما كانت لنتائج اكثر دقة ، وبعد حضن الانابيب يحسب عدد الانابيب التي ظهر فيها نمو (موجبة) وتقارن بجدول احصائي خاص لاستخراج العدد التقريبي ويضرب هذا العدد بمقلوب التخفيف .

المختبر العاشر Lab.(10)

عزل البكتريا في مزارع نقية :

Isolation and Pure Culture Techniques

حينما تزرع البكتريا او اي كائن مجهري في وسط غذائي محضر في المختبر يطلق عليها آنذاك بالمزارع (cultures) . ان الانواع المختلفة للبكتريا النامية على نفس الوسط الزرعي قد تظهر متباينة تماما فلذلك يعتبر من المهم جدا معرفة المظهر الخارجي او خصائص المزارع لتمييز الانواع المختلفة والتي تساعد كذلك في تشخيص النوع فلذا يجب الحصول على البكتريا في مزرعة نقية قبل دراسة وتحديد خصائص المزرعة او أي خاصية اخرى .

ان المزرعة النقية تتكون من مجموعة من الخلايا مشتقة من خلية ام واحدة .

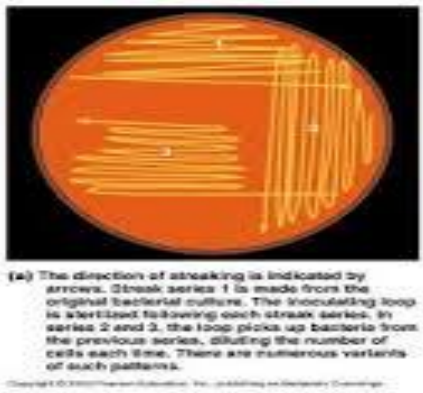
توجد تقنيات مختلفة يمكن بواسطتها عزل الانواع المختلفة الموجودة في العينة الطبيعية المختلطة وانماءها في مزارع نقية .

الطرق المستعملة للحصول على مزارع نقية:

1)العزل بعمل الخطوط او النشر على سطح بيئة غذائية صلبة The streak-plate and spread – plate techniques

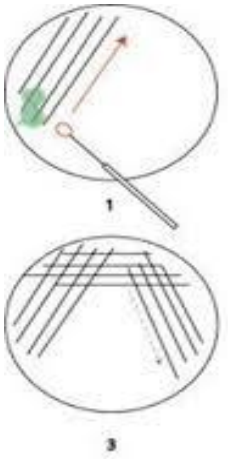
وهي الطريقة الروتينية المعتادة لعزل الميكروبات في مزارع نقية اذ يوضع جزء من عينة الميكروب بواسطة loop معقم على سطح اكار متصلب ومن ثم تعمل خطوط على السطح . يمكن استعمال عصا زجاجية على شكل حرف (L) لنشر العينة على سطح الاكار .

ان هذه الطريقة تخفف من تركيز الميكروبات تدريجيا بحيث يظهر الميكروب بصورة منعزلة الواحدة عن الاخرى .



(a) The direction of streaking is indicated by arrows. Streak series 1 is made from the original bacterial culture. The inoculating loop is sterilized following each streak series. In series 2 and 3, the loop picks up bacteria from the previous series, diluting the number of cells each time. There are numerous variants of such patterns.

(b) In series 3 of this example, notice that well-isolated colonies of bacteria of two different types, red and white, have been obtained.



يوضح الشكل السابق التقنية المستعملة للحصول على مستعمرات معزولة وحينما نعمل الخطوط بطريقة صحيحة فان الخلايا ستبتعد بعضها عن الآخر بمسافات كافية .

ان كل مستعمرة معزولة هي عبارة عن الجيل الناتج من خلية واحدة فلذا تعتبر كل مستعمرة عبارة عن مزرعة نقية وحينما ينقل جزء من هذه المزرعة النقية الى وسط زرعي آخر فسنحصل على مزارع نقية بعد ان توضع لفترة مناسبة في الحاضنة وبدرجة حرارة ملائمة وللتأكد من نقاوة المزارع في الوسط الزرعي يجب ان تفحص مجهريا .

2) العزل عن طريق الصب Pour plate method

عند استعمال هذه التقنية يجب تخفيف العينة الحاوية على نوعين او اكثر من الميكروبات الى درجة كبيرة بطريقة التخافيف العشرية قبل البدء بالعمل بسبب ان المستعمرات ستنمو متقاربة الى درجة كبيرة ويصبح من الصعب عزل المستعمرات بعضها عن الآخر.