HANEEN Hisham

الدرس العملي الأول

تحضير الوسط الغذائي Culture Media Proportion

أهداف التجربة :-

(١) لدراسة الطرق المستعملة في تحضير الأوساط الغذائية الخاصة لنمو الكائنات الدقيقة المختلفة وبالأخص البكتريا , وكيفية تعقيم هذه الأوساط الغذائية وكيفية المحافظة عليها معقمة وبعيدة عن التلوث من الهواء الخارجي تماما .

(٢) معرفة مصدر الكاربون , مصدر الطاقة , مصدر النتروجين والعناصر الغذائية الأخرى في ذلك الوسط وكذلك العامل الذي يعمل على بقاء الوسط الغذائي بحالة صلبة مع ملاحظة سبب عدم وجود أي من المصادر السابقة الذكر .

(٣) لدراسة صفات الآكار- آكار (Agar – Agar) التي تجعله مناسب جدا لتصليب الأوساط الغذائية ومقارنته بمصادر أخرى .

مقدمة : Introduction

من المواضيع المهمة جدا والأساسية في مختبرات المايكروبيولوجي هي طريقة تحضير الوسط الغذائي (الغذاء الذي نستعمله في تنمية الكائنات الدقيقة كل حسب نوعها) بالرغم من صغر حجم الخلية البكتيرية إلا أنها تحتاج إلى غذاء يشابه في تركيبه بدرجة كبيرة الغذاء الذي يحتاجه أي كائن حي آخر , تتركب الخلية البكتيرية من البروتين والكاربوهيدرات إضافة إلى مواد أخرى , وبما أنه هذه المركبات تتكون أصلا من الكاربون والأوكسجين , الهيدروجين , النتروجين لذلك يجب عند تحضير أي وسط غذائي أن نضع في فكرنا توفير هذه العناصر الضرورية في تركيبه إضافة إلى توفير مصدر الطاقة والماء في الوسط الغذائي الضروري لأي كائن حي وكذلك البكتريا والكائنات الدقيقة الأخرى .

أنواع الأوساط الغذائية

تقسم الأوساط الغذائية بصورة عامة إلى قسمين :

(١) الأوساط الغذائية السائلة مثل (Nutrient Broth)

(٢) الأوساط الغذائية الصلبة مثل (Nutrient Agar)

إن الوسط الغذائي الصلب لا يختلف عن الوسط الغذائي السائل وإنما فقط مضاف لها مادة (Agar – Agar) لجعل الوسط في حالة صلبة وذلك لجعل البكتريا تنمو بصورة مستعمرات متفرقة على السطح الصلب وللحصول على بكتريا بصورة نقية (Pure Culture) كذلك تنقسم الأوساط الغذائية إلى أوساط معروفة التركيب الكيمياوي كما ونوعا (Synthetic media) والأوساط غير معروفة التركيب الكيمياوي (Non - Synthetic media) والأمثلة التالية توضح ذلك :

Non - Synthetic media		Synthetic media	
$NaNO_3$	1.0 g	Beef extract	3 g
$MgSO_4$	0.5	Peptone	5 g
$BeSO_4$	0.03 g	Distil Water	1000 ml
$NaCO_3$	1.0 g		
K_2HPO_4	1.0 g		
Distil Water	1000 ml		

أنواع البكتريا بالنسبة لمصدر الكاربون والطاقة :-

تقسم البكتريا بالنسبة لمصدر الكاربون والطاقة إلى قسمين :

القسم الأول :- تستعمل ثاني أوكسيد الكاربون (CO_2) كمصدر رئيسي للكاربون وأكسدة المواد المعدنية كمصدر رئيسي للطاقة , والوسط الغذائي الملائم لنمو البكتريا التابعة لهذا القسم هي (Synthetic media).

القسم الثاني:- تحتاج إلى وجود مادة عضوية في الوسط الغذائي لكي يستعمل كمصدر للكاربون والطاقة , الوسط الغذائي التابع لهذا القسم والملائم لنمو البكتريا هو (Non-Synthetic media) حيث وجود مستخلص اللحم (Beef Extract) هو مصدر عضوي للكاربون والطاقة إضافة للـ (Peptone) الذي يستعمل كمصدر للأوكسجين .

البيئات الصلبة :- **Solid Media**

من المواد التي استعملت قديماً لتصلب البيئات أو الأوساط الغذائية هي إضافة شرائح من البطاطا إلى ذلك الوسط . بما أنه البطاطا تعتبر مصدر جيد للكاربون والطاقة (مادة نشوية أو كاربوهيدراتية) لذلك سوف تستعمل من قبل معظم البكتريا أو الفطريات وبالتالي وبعد فترة قصيرة سوف يتحول الوسط الغذائي من الصلب إلى السائل , لذلك استبدل بالجيلاتين (Gelatin) ربما أن الجيلاتين يعتبر أيضاً مصدر للكاربون والطاقة لأنه مادة بروتينية معقدة ناقصة لذلك وجد أنه قسم من البكتريا المنتجة لأنزيم الـ (Gelatinizes) يمكنها أن تحلله ويتحول الوسط إلى سائل إضافة إلى أن درجة انصهاره (٢٨°م) أي يتحول الوسط من الصلب إلى السائل في أيام الصيف الاعتيادية ومن دون وجود أي نوع من البكتريا , ويجب أن يضاف بنسبة عالية جداً قد تصل إلى (١٥ %) من الوسط (عملية غير اقتصادية) . المادة الملائمة جداً والتي تستعمل في الوقت الحاضر لتحويل الأوسط الغذائية من السائلة إلى الصلبة هي آكار – آكار (Agar – Agar) وهي مادة كاربوهيدراتية شديدة التعقيد تستخرج من بعض أعشاب البحر ويمكن لأي مايكروب أن يحللها وإن درجة انصهارها حوالي (٩٦°م) أي الوسط الغذائي المضاف لها هذه المادة يبقى صلب ولا يتحول إلى سائل إلا عند درجة حرارة أكثر من (٩٦°م) و يتجمد الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة تحت درجة حرارة (٤٢°م) إضافة إلى أنه مستعمل بنسبة أقل بكثير من استعمال الجيلاتين (١،٥ – ٢ %) وفي هذه الحالة إذا كان هناك نوع من البكتريا يمكنها أن تحلله يجب في هذه الحالة استعمال الـ (Sillion gel) في جميع مختبراتنا سوف تستعمل مادة الـ (Agar – Agar) لأنها الأكثر شيوعاً في الوقت الحاضر .

فيما يلي ملخص لأهم الفروق بين الآكار و الجيلاتين :

الخواص	الآكار – آكار	الجيلاتين
١. نسبة إضافة البيئة	١,٥ – ٢ %	١٢ – ١٥ %
٢. تركيبه	مادة كاربوهيدراتية شديدة التعقيد تستخرج من بعض الأعشاب البحرية	مادة بروتينية معقدة ناقصة
٣. درجة انصهاره	٩٦°م	٢٨ – ٣٠°م
٤. درجة تجمده	٤٥°م	تحت ٢٨°م
٥. مقدرة البكتريا على تحلله	جميع أنواع البكتريا تقريبا لا تحلله	تحلله كثير من البكتريا المنتجة لإنزيم الجيلاتيز

تعقيم الأوساط الغذائية :- Sterilization

تحضير أي وسط غذائي (بيئة غذائية) يجب أن يكون خاضع لشرطين أساسيين هما وزن الكميات الدقيقة المضبوطة من المواد الكيمياوية المطلوبة ومن ثم المحافظة على البيئة بصورة معقمة لا طول فترة ممكنة.

والتعقيم هو قتل كل شيء حي وعدم الوصول إلى التعقيم التام هو ليس من صفات الأعمال الميكروبيولوجية لذلك فهم الطرق المختلفة المستعملة في قتل الميكروبات ضروري للتوصل إلى هذا الهدف.

تعقم البيئات الغذائية التي لا تحتوي على مواد تتلف بالحرارة باستعمال جهاز الأوتوكليف (Autoclave) وهو جهاز يشبه تماماً قدر الكاتم المستعمل في معظم المطابخ ولكنه أكبر وأكثر تطوراً منه . في حالة عدم توفر الأوتوكليف يمكن استعمال القدر الكاتم الاعتيادي .

عملية التعقيم بهذا الجهاز تكون اعتيادياً تحت ضغط (١٥ باوند / ١ إنچ^2) ودرجة حرارة (١٢١°م) ولمدة (١٥ – ٢٠ دقيقة) تحسب عندما يصل الضغط إلى (١٥ باوند / ١ إنچ^2) , وتختلف المدة والضغط بحسب حجم البيئة المراد تعقيمها .

الأوساط الغذائية الحاوية على مواد تتلف بالحرارة كالفيتامينات والأحماض الأمينية والسكريات عدا الكلوكوز يجب أن تعقم بطرق أخرى غير الأوتوكليف والطرق المفضلة هي استعمال الترشيح باستعمال مرشحات مختلفة أحدثها (Millipore Filter) ذات الفتحات الدقيقة (٤٥ % ميكرون أو أقل) والتي لا تسمح بمرور البكتريا من خلال المرشح ولكنها تسمح بمرور الفيروسات فقط وبذلك تصبح البيئة معقمة بعد الترشيح (الفيروسات ليست مشكلة بالنسبة لعملنا لأنها تحتاج إلى أنسجة حية لكي تنمو ولا تنمو على وسط غذائي صناعي) .

تحضير الأوساط الغذائية السائلة والصلبة Nutrient Agar and Nutrient Broth

المواد المطلوبة .

- مستخلص اللحم (Beef extract) ٦ غم
- بيتون (Peptone) ١٠غم
- آكار – آكار (Agar – Agar) ٣٦ غم
- ماء مقطر (Distwater) ٢ لتر
- ماصات (Pipettes) حجم ١٠ مل
- بيكر (Beakers) عدد (٢) ٢٥٠ مل
- بيكر (Beakers) عدد (٢) ٥٠٠ مل
- فلاسكات (Flasks) عدد (٢) ٢٥٠ مل
- مصباح بنزن
- ميزان
- قضيب زجاجي (Glass Stirring rod).

طريقة العمل :- Methodology

أولاً : تحضير الـ Nutrient Broth.

نظراً لكثرة عدد الطلاب ولعوامل اقتصادية سوف نقوم بتحضير ربع الكمية أي (٢٥٠ مل) فقط لذلك فجميع الكميات في هذه الحالة يجب أن تقسم على (٤).

١. أمزج (٠،٧٥٠غم) من مستخلص اللحم و (١،٢٥٠غم) من البيتون مع (٢٥٠ مل) من الماء المقطر في بيكر حجمه (٥٠٠ مل) . رج جيداً لحين ذوبان جميع المواد
٢. اضبط درجة حموضة الوسط (pH) باستعمال جهاز (pH meter) عند توفره أو استعمال الطريقة اللونية بإضافة حامض الهيدروكلوريك المخفف أو الصودا الكاوية (NaOH 0.5 N) مع الرج المستمر لتعديل الـ (pH) إلى الدرجة الملائمة لنمو البكتريا مثلاً وهي (٦،٨) . (الأستاذ المسؤول سوف يقوم بشرح مفصل لهاتين الطريقتين)
٣. حضر خمس (٥) أنابيب اختبار من الوسط الغذائي السابق كل منها تحوي على (٨ مل) والباقي ضعه في فلاسكات حجم (٢٥٠ مل) .
٤. غط الأنابيب و الفلاسك بالقطن (القطن سوف لا يسمح بدخول أي كائن حي من الهواء الخارجي إلى الوسط الغذائي (وسوف يقوم الأستاذ المسؤول بتعليمك كيفية عمل السدادات القطنية)
٥. عقم بجهاز الأوتوكليف تحت ضغط (١٥ باوند / ١ انج^2) ودرجة حرارة (١٢١ °م) لمدة (٢٠دقيقة) . (أسأل الأستاذ المختص عن كل خطوة من خطوات التعقيم)

ثانياً : تحضير الـ Nutrient Agar

١. زن (٠،٧٥٠ غم) من مستخلص اللحم و (١،٢٥٠ غم) من الببتون و (٤،٥ غم) من الـ Agar – Agar في (٢٥٠ مل) من الماء المقطر في بيكر حجمه (٥٠٠ مل) , حدد بعلامة مستوى الماء في البيكر لكي يتم تعويض الماء المفقود أثناء الغليان .

٢. أغلي المخلوط السابق على مصباح بنزن مع الرج المستمر لكي لا تلتصق البيلة بأسفل البيكر وإلى أن يذوب الآكار (أطفئ النار بعد الغليان مباشرة) .

٣. أضبط الـ (pH) بالطريقة السابقة .

٤. حضر (٣) أنابيب اختبار كل منها يحوي على (٦ مل) (حسب حجم الأنبوبة المتوفرة) وأعملها بطريقة الآكار المائل (Slant) و (٣) أنابيب بطريقة الـ (Agar Deep)كل منها يحوي (٦مل) أيضا وثلاثة بطريقة الـ (Agar Pour) كل منها يحوي على حوالي (١٣مل) والباقي تضعه في فلاسك حجمه (٢٥٠ مل) (أسأل الأستاذ المختص عن معنى كل من المصطلحات السابقة) .

٥. غطِ الأنابيب و الفلاسكات بالقطن .

٦. عقم بنفس الطريقة السابقة .

الدرس العملي الثاني / القسم الأول

التعقيم Sterilization

أهداف التجربة :-

الهدف من التجربة هو دراسة الطرق المختلفة المستعملة في تعقيم المواد الميكروبيولوجية بالتفصيل .

جميع الدراسات البكتريولوجية تحتاج إلى الاشتغال بمزرعة نقية خالية من أي تلوث , من هنا نشأة فكرة تعقيم المواد التي تستعملها في مثل هذه الدراسات من الزجاجيات إلى أجهزة ومواد أخرى لأنها جميعها معرضة إلى الهواء الجوي الحاوي على جميع الميكروبات المعروفة سواء بصورة مباشرة إلى غير مباشرة .

أهم الطرق والعوامل الطبيعية في التعقيم هي الحرارة وهذه تكون بواسطة اللهب المباشر , الهواء الجاف و الهواء الرطب إلى الخ..... .

١. التعقيم باللهب المباشر :

يتم ذلك بواسطة مصباح بنزن ويستعمل في تعقيم ابر التلقيح وأفواه المزارع الميكروبيولوجية والشرائح الزجاجية وغيرها .

٢. التعقيم بالهواء الساخن : Hot Air Sterilization

تستعمل هذه الطريقة في تعقيم الأدوات الزجاجية التي تتطلب في حالة جافة مثل أطباق بتري وزجاجيات العينة والدوارق والأنابيب والماصات البكتريولوجية وغيرها .

تصل درجة الحرارة في جهاز التعقيم بالهواء الساخن إلى (١٦٠ – ١٨٠ ْم) ولمدة (١- ٣ ساعة)

تعقيم الأطباق والماصات في هذا الجهاز باستخدام علب خاصة من الألمنيوم أو الصلب غير قابل للصدأ أو النحاس تسمى علب تعقيم الأطباق أو الماصات وبعد التعقيم تحفظ هذه العلب في أماكن تمنع إعادة تلوث هذه الأدوات .

الاحتياطات التي تراعى عند إجراء هذه الطريقة :-

- الأدوات الزجاجية تكون غير مبللة
- إذا كانت الأدوات ملفوفة بورق أو مغطاة بسدادات قطنية يجب ألا تزيد درجة الحرارة عن (١٦٠ ْم)
- وضع الأدوات مرتبة في الجهاز قبل التسخين .
- وضع الأدوات بطريقة تساعد على مرور التيارات الهوائية الساخنة .
- يحسب الوقت اللازم للتعقيم بعد وصول درجة الحرارة إلى الدرجة المطلوبة .
- عدم فتح الجهاز إلا بعد انخفاض درجة الحرارة إلى درجة مقارنة لدرجة الجو

س / كيفية استخدام جهاز أرنولد في التعقيم ؟

٣. التعقيم بالبخار المتقطع : Intermittence Sterilization .

يستعمل هذا الغرض من الأجهزة منها جهاز أرنولد (Arnold Sterilizer) وتعقم بهذه الطريقة المواد التي تتلف أو تتغير خواصها الطبيعية و الكيمياوية عند تسخينها إلى درجة حرارة أعلى من (١٠٠ م) مثل البيئات الحليب و الجيلاتين والبيئات المحتوية على بعض السكريات . وفي مثل هذه الطريقة تعرض البيئات إلى درجة حرارة (١٠٠ م) " درجة حرارة بخار الماء " في المعقم لمدة نصف ساعة (٣٠ دقيقة) ولثلاثة أيام متتالية تكرر هذه العملية , وتعتمد هذه الطريقة على أنه في اليوم الأول يقتل الخلايا الخضرية فقط ولا يقتل الجراثيم وعند التحضين على درجة مناسبة ولوجود المادة الغذائية تنبت الجراثيم وتتحول إلى خلايا خضرية تقتل عند التسخين على درجة حرارة (١٠٠ م) ولمدة نصف ساعة في اليوم الثاني , وفي اليوم الثالث تجرى نفس العملية للتأكد ولضمان دقة وكفاءة عملية التعقيم .

الاحتياطات التي تراعى عند إجراء هذه الطريقة :-

- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار .
- يحسب الزمن اللازم بعد وصول درجة الحرارة إلى (١٠٠ م) وليس من بدء تشغيل الجهاز .
- إخراج البيئات من الجهاز بعد انتهاء المدة اللازمة مباشرة .
- يجب أن تكون المادة المعقمة مادة غذائية وأن تكون السدادة تسمح بمرور البخار إلى الداخل .

٤. التعقيم بالبخار تحت الضغط : Sterilization Under Pressure

يستعمل للتعقيم بهذه الطريقة جهاز الأوتوكليف الذي يعمل كقدر كاتم . من المعروف أن الحرارة الرطبة لها أثر أكبر في قتل الميكروبات من الحرارة الجافة , وتعقيم معظم البيئات البكتريولوجية التي لا تتلف عند تعرضها لدرجات الحرارة العالية أعلى من (١٠٠ م) . يستخدم الأوتوكليف أيضاً في المزارع البكتيرية غير المطلوبة مثل بيئة الآكار المغذي.

وتعتمد هذه الطريقة على التوليد البخار بكمية كبيرة في إناء قوي الجدران مصنوع من الصلب غير القابل للصدأ (Stainless steel) أو النحاس (Copper) . يوجد بأسفل الجهاز سخان كهربائي أو غازي وللجهاز غطاء يقفل بإحكام شديد وعلى ذلك فان زيادة بخار الماء داخل الجهاز يؤدي إلى رفع درجة الحرارة عن (١٠٠ م) ويرتفع الضغط طردي مع زيادة كمية بخار الماء حيث يقابل ذلك رفع درجة حرارة غليان الماء .

الضغط الجوي الظاهري	درجة الحرارة	المدة اللازمة للتعقيم
٢/١ ض.جوي	١١٣م	٣٠ دقيقة
١ ض.جوي	١٢١م	١٥- ٢٠ دقيقة
١،٥ ض.جوي	١٢٨م	٥ دقائق
٢ ض.جوي	١٣٤م	ثوان فقط

وتصل درجة الحرارة إلى الدرجات المبينة أعلاه إذا كان الأوتوكليف يحوي على بخار فقط خالي تماما من الهواء .

الاحتياطات التي تراعى عند تشغيل جهاز الأوتوكليف :-

- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار المطلوب
- التأكد من أن البخار يملأ الجهاز تماماً وحل محل الهواء في الجهاز
- يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد الوصول إلى الضغط المطلوب .
- لا يفتح الجهاز إلا بعد أن ينخفض الضغط داخل الجهاز إلى الضغط الجوي العادي .

٥. التعقيم بواسطة الترشيح : Sterilization Filtration

بعض البيئات السائلة الحاوية على المواد تتلف بالحرارة كالفيتامينات, الأنزيمات, المضادات الحيوية, سيرم الدم, الأحماض الأمينية, سموم البكتريا, ... الخ تعقم باستخدام مرشحات بكتريولوجية قطر ثقوبها لا يسمح بمرور أي من الميكروبات المغروفة ما عدا الفيروسات من هذه المرشحات .

a / Seitz Filter : يتركب من قمع من المعدن غير قابل للصدأ وأقراص للترشيح المصنوعة من الأسبستوس أو السليلوز أو الاستيل سليلوز .

b / Chamber and Filter : مصنوع من الخزف غير مصقول .

c / Sintered glass Filter : مصنوع من ألياف زجاجية متشابكة .

الاحتياطات التي تراعى عند التعقيم :-

- يجب تعقيم جهاز الترشيح بجميع ملحقاته بعد لفه بورق سميك مانع للرطوبة .
- يجب عند التعقيم بهذه الطريقة استخدام التفريغ للإسراع في عملية الترشيح .
- يجب اختبار دقة السوائل المرشحة (sterility) ويتم ذلك بتلقيح جزء من الراشح في بيئة قياسية وتحضيرها على حرارة مناسبة فإذا لم يظهر نمو في هذه البيئة فيدل ذلك على دقة عملية التعقيم .
- بعد الانتهاء من عملية الترشيح تنظف المرشحات جيداً .

ترشيح الغازات :-

تحتاج بعض الأعمال الميكروبيولوجية إلى تعقيم الغازات خاصة عند إمرار هذه الغازات في المزارع الميكروبيولوجية مثل الأوكسجين لتشجيع نمو الميكروبات الهوائية أو التعقيم الهواء الداخل إلى غرف معقمة كما في معامل تعبئة الأدوية حيث يجب أن يكون الهواء خالي من أي تلوث . ترشح الغازات عادة بتمريرها على طبقات سميكة من القطن المضغوط المعقم أو باستعمال طرق أخرى .

٦. التعقيم بواسطة الإشعاع : Sterilization by Radiation

تستعمل الأشعة المؤينة كأشعة (Gamma and X-Ray) في تعقيم الحقن , أطباق بتري البلاستيكية والتي جميعها تستعمل لمرة واحدة فقط (Disposable) وكذلك تستعمل أيضاً في تعقيم اللقاحات (Vaccines) تستعمل أيضاً الأشعة غير المؤينة مثل الأشعة الفوق البنفسجية (Ultra – Violet) من خلال مصابيح خاصة معدة لإغراض التعقيم .

٧. التعقيم بالمواد الكيمياوية : Sterilization by Chemical Agents

بعض المواد الكيمياوية ومدى تأثيرها على الميكروبات و التراكيز الفعالة منها

المواد الكيمياوية	التركيز الفعال	استخداماتها
• حامض الخليك	١%	مادة حافظة للمواد الغذائية - المخللات
• حامض البنزويك	٠،٠١%	مادة حافظة للمواد الغذائية-المشروبات" عصير الفاكهة"
• حامض اللاكتيك	٠،٠١%	مادة حافظة للمواد الغذائية – المخللات
• كحول الأثيل	٧٥%	يقتل الخلايا الخضرية ولا يقتل الجراثيم الداخلية للبكتريا
• فورمالدهايد	٥%	يقتل كل الخلايا الميكروبية
• فورمالدهيد	غاز	يقتل كل الخلايا وفي حالة تعقيم الغرفة وفيها تقفل الغرفة وتترك (٦) ساعات لهذه الأبخرة
• كلوريد الزنبقيك	٠،١%	تقتل الميكروبات – تعقيم البذور
• الفينول	٠,٥%	يقتل معظم الميكروبات
• الديتول	٢%	يقتل الميكروبات – يعقم الأيدي ويعقم المناضد

ملاحظة (Note) :- يستخدم المواد الكيمياوية في عمليات التعقيم على نطاق واسع في مصانع الأغذية الألبان وفي حفظ الألياف القطنية والجلود .

الدرس العملي الثاني / القسم الثاني

التلقيح Inoculation

أهداف التجربة :-

الهدف من التجربة هو التدريب على كيفية إجراء تلقيح الأوساط الغذائية التي تم تحضيرها في الدروس العملية السابقة ببكتريا معزولة عن الهواء .

طريقة العمل :- **Methodology**

- عرض الوسط الغذائي المعقم (Nutrient Agar) الموجود في الطبق بتري المعقم لهواء المختبر وذلك بفتحه لمدة ساعة . غط الطبق ومن ثم حضن على درجة حرارة (٢٨°م) ولمدة (٤٨ ساعة). العملية هذه سوف تجرى أيضاً من قبل الأستاذ المسؤول عن المختبر قبل الدرس العملي بيومين لكي تكون جاهزة لها الدرس . أدرس صفات المستعمرات النامية باستعمال الرسومات المرفقة .
- لقح باستعمال إبرة التلقيح المعقمة كل منهن خمسة أنابيب اختبار التي حضرتها في الدرس العملي الأول والحاوية على (Nutrient Broth) بكل من خمسة مستعمرات مختلفة (كل مستعمرة يؤخذ منها لمسة أو عقدة وتنقل إلى إحدى هذه الأنابيب مع مراعاة شروط التعقيم ومن ثم تغطي بالقطن وتنتقل إلى الأنبوبة الأخرى وتلقحها بمستعمرة أخرى ومن ثم الأنبوبة الثالثة وهكذا) يجب تعقيم إبرة التلقيح . في كل مرة كرر نفس العملية في تلقيح كل من الأنابيب الحاوية على الآكار المائل (Agar Slant) حضن على درجة حرارة (٢٨°م) ولمدة (٤٨ – ٧٢ ساعة). أدرس صفات البكتريا النامية بالطرق التي سوف تشرح بالدرس الذي يليه .

الدرس العملي الثالث / القسم الأول

الميكروسكوب The Microscope

من أكثر الأجهزة المستعملة في دراسة علم الميكروبيولوجي هو الميكروسكوب وهناك أنواع كثيرة من الميكروسكوب البسيط والمركب (Compound Microscope) والميكروسكوب المتمم (Phase Contrast Microscope) والميكروسكوب الالكتروني (Electronic Microscope) الذي يهمنا في هذا المختبر هو الميكروسكوب المركب لذلك فالتعرف على أجزاءه وكيفية استعماله يعتبر ضروري جدا لدراسة الكائنات الدقيقة المختلفة سواء من الناحية المورفولوجية (الوصفية) أو من الناحية العددية .

وصف الميكروسكوب المركب :

يتكون الميكروسكوب المركب من مجموعتين من الأجزاء : المجموعة الآلية والمجموعة البصرية .

أولاً : المجموعة الآلية :- Mechanical Parts

وهي الأجزاء التي تستعمل في تحريك المجموعة البصرية وتتكون الآلية من الحامل (Stand) الذي يتركب على قاعدة (Base) ومركب على الحامل أعلاه الذراع (Arm) الذي يحمل الميكروسكوب بواسطته . في أسفل الحامل يوجد المسرح (Stage) الذي توضع عليه الشريحة المراد فحصها وفي أعلى الحامل توجد الأنبوبة (Tube) التي تحمل في أعلاها العدسة العينية (Ocular Lenses) وتحمل في أسفلها العدسة الشيئية (Objective Lenses) المركبة على القطعة الأنفية (Nose Piece) التي يمكن تحريكها حركة دائرية للانتقال من العدسة الصغرى مثلا إلى العدسة ذات القوى الكبرى . يركب على الذراع كذلك الضابط (المنظم) التقريبي (Coarse adjustment) والضابط الدقيق (Fine adjustment) ويستعمل المنظم التقريبي في تحريك الأنبوبة الميكروسكوبية بصورة سريعة نسبياً في حين تستعمل المنظم الدقيق تحريك الأنبوبة حركة بطيئة نسبياً حتى يمكننا رؤية الخلايا في أوضح صورة .

ثانياً : المجموعة البصرية :- وتتكون من :

١. العدسة العينية Ocular Lenses :-

وظيفة العدسة العينية هو تكبير صورة المرئي الحقيقية الناتجة من العدسة الشيئية وقوة تكبيرها عادة (١٠) مرات .

٢. العدسة الشيئية Objective Lenses :-

وهي عادة ثلاث عدسات وظيفتها تكوين صورة حقيقية معكوسة ومكبرة داخل جزء الأنبوبة العلوي وقوة تكبير العدسة الصغرى Low power قوة تكبيرها (١٠) مرات وبُعدها البؤري (١٦ ملم) . والعدسة الكبرى الجافة High power وقوة تكبيرها (٤٠) مرة وبُعدها البؤري (٣،٢ – ٤ ملم) والعدسة

ثانياً : طريقة فحص حركة البكتريا بالقطرة المعلقة Hanging Drop Slide

عند فحص حركة البكتريا بهذه الطريقة (سوف تشرح مؤخراً بالتفصيل) يجب أيضاً استعمال العدسة ذات القوة الصغرى أولاً ومن ثم الانتقال إلى العدسة ذات القوة الكبرى الجافة (x٤٠) مع خفض المكثف قليلاً وفتح الحجاب فتحة صغيرة وحرك المنظم الدقيق قليلاً وببطء إلى أن تحصل على أوضح صورة للخلايا المتحركة . سوف نستعمل نفس طريقة الفحص هذه عند دراسة الفطريات مستقبلاً .

ملاحظة (Note) :- لا تستعمل العدسة الزيتية مطلقاً وفي كلتا الحالتين .

ثالثاً : طريقة فحص المستعمرات البكتيرية Bacterial Colonies

تستخدم لذلك العدسة الصغرى فقط (x١٠) مع تقليل الإضاءة عند الفحص .

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند استخدام الميكروسكوب :-

- التأكد من نظافة العدسات والمكثف والمرآة قبل البدء في العمل .
- لا تلمس العدسات بأصابعك أبداً .
- لا تنقل العدسات من مكانها .
- في حالة استخدامك للعدسة الزيتية المنغمسة وعند الانتهاء من استعمالها أزل الزيت المتبقي على العدسة باستخدام أوراق تنظيف العدسات (Lens tissues) المبللة بالزيلول (Xylol) لان هذا يمنع تخدش العدسة كنتيجة لالتصاق الزيت وتجمع الأوساخ في تحليلها . في حالة عدم توفر مثل هذه الأوراق الخاصة يمكنك استخدام ورق السكائر الرقيقة مع ملاحظة عدم استخدام القطن أو أوراق الترشيح لأنها سوف تترك ألياف رفيعة على العدسة وتؤدي أيضاً إلى تخديش وتلف العدسة .
- أحمل الميكروسكوب من الحامل بيد ووضع اليد الأخرى على أسفل الميكروسكوب وذلك عند نقله من مكان إلى آخر , وملاحظة تغطية الميكروسكوب بالغطاء البلاستيكي قبل وضعه بالصندوق الخاص به للمحافظة عليه من تراكم الأتربة والمواد الأخر .

المعقمة وتوضع على الشريحة الزجاجية وتعقم إبرة التلقيح ثانية ويؤخذ عقدة من المزرعة الصلبة وتخلط جيداً مع قطرة الماء وتفرش جيداً للحصول على غشاء رقيق .

٣. أترك الغشاء لكي يجف تحت ظروف المختبر (Agar – Agar) .

٤. ثبت الغشاء بعد جفافه وذلك بتمريره من خلال مصباح بنزن خمس أو ست مرات (لا تضع الغشاء مباشرة على مصباح بنزن لان ذلك سوف يحرق جميع الخلايا الخضرية) .

هذه العملية أي عملية تمرير السلايد من خلال مصباح بنزن سوف يؤدي إلى قتل الخلايا البكتيرية وتثبيتها على الشريحة الزجاجية لكي لا تغسل أثناء إجراء عملية التصبيغ .

٥. بعد ذلك سوف يكون الغشاء جاهز لإجراء عملية التصبيغ .

التصبيغ البسيط :- Simple Staining

- أصبغ كل من الأغشية السابقة التي حضرتها بصبغة الـ (Safranin) وذلك بإضافة مقدار مناسب من الصبغة يكفي لتغطية الغشاء وأترك الصبغة لمدة (٤٥ ثانية) .
- تخلص من الزائد من الصبغة في حوض الصبغ ثم أغسل الشريحة باحتراس بتيار هادئ من ماء الحنفية ثم جفف بين ورقتي نشاف .
- أفحص الأغشية المصبوغة باستخدام العدسة ذات القوة الصغرى (x١٠) أولاً وحرك المنظم التقريبي إلى أن تحصل على آثار الصبغة , بعد ذلك ضع قطرة صغيرة من الزيت وأنتقل إلى العدسة الزيتية المنغمسة ووضح الصورة باستعمال المنظم الدقيق قليلاً وببطء إلى أن تحصل على صورة واضحة لإشكال الخلايا البكتيرية . أرسم ما تشاهده مع وصف شكل وتجمعات الخلايا

الدرس العملي السادس

طرق عد البكتريا

أولاً : طريقة العد المباشر باستعمال الميكروسكوب Direct Microscopic Count

تستعمل هذه الطريقة عندما نرغب في حساب أعداد البكتريا الموجودة في عينة من الحليب الخام مثلاً لمعرفة درجة ونوعية الحليب من حيث التلوث . تتم هذه الطريقة بصبغ كمية معروفة الحجم من الحليب (٠،٠١ مل) المفروشة على مساحة معروفة من السلايد (١ سم^{٢}) ومن ثم فحص السلايد تحت الميكروسكوب وعد الخلايا البكتيرية الموجودة في المجال الميكروسكوبي (Microscopic Field) الذي هو الجزء من السلايد الذي يمكن رؤيته في الميكروسكوب وبطريقة حسابية بسيطة يمكن معرفة أعداد البكتريا الموجودة في حجم الحليب وذلك بحساب مساحة المجال الميكروسكوبي الواحد ومن ثم حساب عدد المجالات الميكروسكوبية الموجودة في (١ سم^{٢}) ويضرب عدد البكتريا الموجودة في المجال الميكروسكوبي الواحد في عدد المجالات نستخرج البكتريا الموجودة في العينة المفروشة على (١ سم^{٢}) ويضرب الرقم الأخير في (١٠٠) نستخرج عدد البكتريا الموجودة في (١ مل) من الحليب الخام .

بالرغم من أنه هذه الطريقة تعتبر أسرع الطرق المعروفة لعد البكتريا وكذلك لا تحتاج إلى أجهزة معقدة إلا أنها تعطي أعداد أكثر بكثير من العدد الأصلي الموجود في عينة الحليب لأنه باستعمال هذه الطريقة سوف لا نتمكن من التمييز بين الخلايا الحية والخلايا الميتة .

المواد اللازمة :-

- عينة من الحليب الخام والحليب المعقم (لمقارنة أعداد البكتريا الموجودة في كل منهما) .
- صبغة أزرق المثيلين (Methyl Blue) .
- كحول (٩٥%) .
- زايلول .
- حمام ماني .
- سلايد عدد (٢) و ماصة حجم (٠،٠١ مل) .
- ميكروسكوب

طريقة العمل :- Methodology

١: ضع السلايد الاعتيادي على ورقة خطوط بيانية وارسم مربعين من كل طرف من طرفي السلايد مساحة كل منهم (١ سم^{٢}) بالضبط , أقلب السلايد (سوف نأخذ مربعين للحصول على نتائج أدق) .

٢. غسل الماصة من الداخل عدة مرات بالحليب وذلك بسحب كمية معينة ونفخه ومن ثم خذ (٠،٠١ مل) من عينة الحليب الخام بعد رجه (٣٥) مرة وأفرشها جيداً بحيث لا تتعدى (١ سم^{٢}) بالضبط

ملاحظة (Note) :- يراعى تجفيف الحليب من خارج الماصة بواسطة ورق الترشيح لكي لا نأخذ أكثر من الحجم المطلوب .

كرر نفس العملية وذلك بأخذ كمية أخرى من نفس الحليب (٠،٠١ مل) وفرشه جيداً على المربع الآخر , أترك السلايد يجف تحت هواء المختبر (Air dry) .

٣. ضع السلايد على الحمام المائي لمدة خمس دقائق وذلك لتثبيت الأغشية البكتيرية على المربعين . (لاحظ اختلاف هذه الطريقة عن الطرق الأخرى) .

٤. خذ السلايد من الحمام المائي وأضف قطرات من الزايول وبصورة جيدة للتخلص من الحبيبات الدهنية الموجودة في الحليب , تخلص من الزايلول الزائد بغمر السلايد بالكحول .

٥. أغمس السلايد في بيكر من الماء البارد للتخلص من الكحول .

٦. أصبغ السلايد بصبغة أزرق المثيلين ولمدة نصف دقيقة (٣٠ ثانية) بعد ذلك أغمس السلايد في بيكر الماء البارد للتخلص من الصبغة الزائدة .

٧. أغسل السلايد بالكحول وإلى أن يصبح لون الكحول المغسول أزرق باهت ومن ثم أغسل السلايد في بيكر الماء البارد .

٨. أترك السلايد يجف في هواء المختبر ومن ثم أفحص تحت العدسة الصغرى أولاً ومن ثم بالعدسة الزيتية المنغمسة بعد وضع قطرة من الزيت .

٩. عد البكتريا الموجودة في المجال الميكروسكوبي الواحد ومن ثم أحسب عدد البكتريا في (١ مل) من الحليب الخام .

١٠. كرر نفس الخطوات السابقة على الحليب المعقم باستعمال ماصة جديدة .

كيفية حساب مساحة المجال الميكروسكوبي :-

قبل عد البكتريا في كل مجال من الضروري حساب مساحة هذا المجال وللحصول على ذلك يجب أن نستعمل سلايد آخر خاص يسمى (Stage Micrometer) " شريحة مايكرومترية مقسمة إلى عدة أقسام المسافة بين القسم والآخر (١٠) ميكرون يستعمل كدليل لمعرفة قطر المجال الميكروسكوبي تحت العدسة الزيتية " يوضع تحت العدسة الزيتية ويوضح وتحسب عدد الخطوط بعدها نضرب عدد الأقسام المشمولة تحت المجال في (١٠) لنحصل على قطر المجال وبذلك يمكن حساب مساحة المجال الذي هو نفسه عبارة عن مساحة الدائرة والتي هي (نق^{٢} . ط) .

طريقة العمل :- **Methodology**

- ضع الشريحة الميكرومترية على الميكروسكوب بوجود القوة (x10) ووضح الخطوط ومن ثم أنتقل إلى العدسة الزيتية بعد وضع قطرة من الزيت ووضح الخطوط وأحسب عددها وليكن مثلاً (١٦) خط

١٦.٠ * ١٠ = ١٦٠ ميكرون قطر المجال

مساحة المجال = نق^٢ . ط

$$\text{مساحة المجال في (١ سم}^٢\text{)} = \frac{١٠٠٠٠ * ١٠٠٠٠}{٢٠٠٠٠} = ٥٠٠٠$$

يفضل حساب عدد البكتريا في عدة مجالات ومن ثم أخذ المتوسط .

متوسط عدد البكتريا في المجال * ٥٠٠٠ = عدد البكتريا في (١ سم^٢) وهو نفسه في (٠.٠١ مل) من الحليب الخام .

عدد البكتريا في (٠.٠١ مل) * ١٠٠ = عدد البكتريا في (١ مل) من الحليب

قطر المجال = المسافة بين الخطوط x عدد الخطوط في المجال

١٠ x ١٦ = ١٦٠ قطر المجال

مساحة المجال = نصف القطر x النسبة الثابتة ($\frac{22}{7}$ او 3.14)

نق^2 x نسبة ثابتة ($\frac{22}{7}$ او 3.14)

$(80)^2 \times 3.14 = 20000.$ مايكرون

مساحة المجال في ($1cm^2$) = $\frac{10000 \times 10000}{\text{مساحة المجال المايكروسكوبي } 20000} = 5000$

عدد البكتريا ($1cm^2$) = متوسط عدد البكتريا x مساحة المجال ($1cm^2$)

$5000 \times 12 = 60000$

طريقة العد المباشر عدد البكتريا في (المل) x 1000

6×10^9

ثانياً : طريقة الأطباق المصبوبة Standard Plate Technique

لقياس أعداد البكتريا الحية فقط سوف نستعمل طريقة الأطباق باستعمال وسط غذائي يساعد على نمو البكتريا . الطريقة تتألف من تخفيف البكتريا باستعمال سلسلة من الـ (dilution Blanks) والتي هي عبارة عن أنابيب اختبار تحوي كل منها على (٩ مل) أو فلاسكات تحوي كل منها على (٩٩ مل) من الماء المقطر المعقم (أحياناً يستعمل محلول من ٠،٨٥% ملح الطعام بالماء المقطر) .

بعد إجراء التخفيفات المطلوبة ينقل حجم معين (٠،١ م) في حالة استعمال الأطباق المصبوبة أصلاً وفرشه على سطح الوسط الغذائي أو (١ مل) في حالة استعمال أطباق فارغة ليصب الوسط الغذائي عليها مؤخراً) . توضع الأطباق بعد ذلك في الحاضنة وتترك لكي تنمو على درجة حرارة ملائمة لتكون مستعمرات مميزة وواضحة . بعد ذلك نعد المستعمرات النامية وعددها هو نفس عدد الخلايا البكتيرية التي كانت موجودة في (١ مل) من ذلك التخفيف . يضرب هذا العدد في مقلوب التخفيف ليستخرج عدد البكتريا في (١ مل) من العينة الأصلية من دون تخفيف .

للحصول على نتائج دقيقة يجب أن تستعمل هذه الطريقة بعناية ودقة في عمل التخفيف ورجها بصورة جيدة وعمل مكررات (خمسة عادة) من كل تخفيف . في مختبرنا هذا ولعوامل اقتصادية سوف لا تستعمل المكررات , كذلك سوف نحاول بهذه الطريقة عد البكتريا الموجودة في الحليب الخام بأخذ (١ مل) من كل تخفيف ووضعه في طبق بتري فارغ ومن ثم صب الوسط الغذائي عليه وكذلك عد البكتريا الموجودة في مزرعة خليطه بأخذ (٠،١ مل) من كل تخفيف وفرشه باستعمال قضيب زجاجي خاص على سطح الوسط الغذائي المصبوب أصلاً .

المواد اللازمة :-

- حليب خام .
- مزرعة مختلطة من البكتريا
- وسط غذائي (Nutrient Agar) .
- أنابيب اختبار عدد (٥) تحوي كل منها (٩ مل) من الماء المقطر المعقم .
- فلاسك يحوي (٩٩ مل) ماء مقطر معقم . ماصة حجم (١ مل) معقمة .
- أطباق بتري .

طريقة العمل :- Methodology

١. أذب الوسط الغذائي (Nutrient Agar) في حمام مائي درجة حرارته (٥٠°م) لكي لا يتصلب .
٢. باستعمال الماصة خذ (١ مل) من الحليب الخام بعد رجه على الأقل (٢٥) مرة ووضعه في فلاسك يحوي (٩٩ مل) ماء مقطر معقم فتحصل على تخفيف (١/١٠٠) , ضع علامة واضحة تشير إلى رقم التخفيف .

٣. بعد الرج الجيد أنقل (١ مل) من التخفيف السابق باستعمال ماصة جديدة إلى أنبوبة اختبار تحوي (٩ مل) من الماء المقطر المعقم فتحصل على تخفيف (١/١٠٠٠)

٤. بعد الرج الجيد وباستعمال ماصة جديدة أنقل (١ مل) من التخفيف (١/١٠٠٠) إلى أنبوبة أخرى تحوي (٩ مل) ماء مقطر معقم فتحصل على تخفيف (١/١٠٠٠٠)

٥. بعد الرج الجيد وباستعمال ماصة جديدة أنقل (١ مل) من التخفيف (١/١٠٠٠٠) إلى أنبوبة تحوي (٩ مل) ماء مقطر معقم فتحصل على تخفيف (١/ ١٠٠٠٠٠) .

٦. ضع علامة واضحة على كل من ثلاثة أطباق بتري المعقمة تشير إلى أرقام التخافيف التالية (١/١٠٠٠ , ١/١٠٠٠٠ , ١/١٠٠٠٠٠) وأنقل (١ مل) من كل تخفيف إلى كل من أطباق بتري (١ مل في كل طبق) مستعملاً ماصة جديدة لكل تخفيف أو استعمال ماصة واحدة بشرط أن تبدأ من التخفيف (١/١٠٠٠٠٠) ومن ثم التخفيف (١ /١٠٠٠٠) ومن ثم التخفيف (١/١٠٠٠) . يجب عمل مكررات من كل تخفيف ولكن لأسباب اقتصادية ولكثرة عدد الطلبة لا يكون عندنا مكررات .

٧. أضف لكل طبق بتري كمية من الوسط الغذائي (بحيث تغطي سطح الطبق) وحرك كل طبق على شكل حرف (S) وقبل أن تتجمد البيئة . أترك بعد ذلك البيئة الملحقة تتصلب .

٨. ضع الأطباق مقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة (٣٥°م) ولمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة .

٩. بعدها عد المستعمرات في كل طبق والتي يتراوح عددها بين (٣٠ – ٣٠٠) مستعمرة واضرب عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف فتحصل على عدد البكتريا في (١ مل) من الحليب . أضرب العدد الأخير في حجم الحليب فتحصل على عدد البكتريا في عينة الحليب الأصلية .

١٠. لعد البكتريا الموجودة في المزرعة المختلطة سوف نستعمل الطريقة الثانية وهي (إضافة اللقاح على البيئة الصلبة) نقوم بعمل تخفيفات (١/١٠٠ , ١/١٠٠٠٠ , ١/١٠٠٠٠٠) بنفس الطريقة وبعد الرج الجيد لكل تخفيف .

١١. تذوب البيئة في الحمام المائي وتبرد إلى حوالي (٥٠°م) ومن ثم تصب في كل من ثلاثة أطباق بتري المعقمة والمرقمة حسب عامل التخفيف .

١٢. أنقل (٠،١ مل) من كل تخفيف من التخافيف (١/١٠٠ , ١/١٠٠٠٠ , ١/١٠٠٠٠٠) إلى كل من الثلاثة أطباق السابقة متبعاً شروط التعقيم باستعمال ماصة جديدة لكل تخفيف أو استعمال ماصة واحدة بشرط الابتداء بالتخفيف الأعلى (١/١٠٠٠٠٠) .

١٣. أفرش اللقاح (٠،١ مل) من كل تخفيف على سطح البيئة باستعمال القضيب الزجاجي الخاص الذي يعقم بغمسه بالكحول على مصباح بنزن لحرق الكحول ومن ثم تبريده لكي لا يقتل البكتريا الملقحة .

١٤. ضع في الحاضنة على درجة حرارة (٣٥°م) لمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة .

١٥. عد المستعمرات النامية في كل طبق بتري من كل تخفيف واضرب العدد في (١٠) لأنه (٠،١ مل) المأخوذ من الطبق ومن ثم أضرب في مقلوب التخفيف لتحصل على عدد البكتريا في (١ مل) من المزرعة المختلطة .

ثالثاً : طريقة التخطيط للحصول على مزرعة نقية Streak Plate Technique

هناك عدة طرق يمكن الحصول بواسطتها على مزرعة نقية (Pure Culture) والأكثر شيوعاً هي الأطباق المخطوطة (Streaking) أو تسمى (Streak Plate Technique) والتي بواسطتها سوف نعمل على تخفيف البكتريا من المزرعة المختلطة بطريقة بحيث يمكن أن نعزل نوع من البكتريا عن النوع الآخر , في هذه الطريقة سوف نتمكن من عزل أربع أو خمس أنواع من البكتريا عن بعضها وبشكل مستعمرات منفردة .

نظراً لكثرة عدد الطلبة ولعوامل اقتصادية سوف نقسم الشعبة إلى أربع مجاميع وكل مجموعة سوف تأخذ أنبوبتين كل منها خاوية على الوسط الغذائي (Nutrient Agar) والتي حضرناها من الدرس العملي الثاني تحت أسم (Agar Pour) و نغليها في الحمام المائي لتذوب مادة الآكار ومن ثم تبريدها إلى درجة حرارة (٤٥ م) وصب محتويات كل منها في طبق بتري المعقم مراعياً شروط التعقيم أثناء الصب وحسب إرشادات المدرس المختص . بعد ذلك تترك لكي تتصلب ومن ثم تخطط .

المواد اللازمة :-

طريقة العمل :- Methodology

١. عقم المنضدة أو البنج الذي سوف تشتغل عليه
٢. سجل أسم المجموعة والتاريخ على الجزء السفلي من كل طبق من أطباق بتري المعقمة (لا تفتح الطبق) .
٣. ذوب الفلاسك الحاوي على الآكار المغذي في الحمام المائي وأسكبه في كل طبق من أطباق بتري المعقمة وذلك بفتحه قليلاً مراعياً شروط التعقيم ومنع أي تلوث وتسخين فوهة الفلاسك قبل الصب للقضاء على كل البكتريا التي حول فوهة الفلاسك وبعد الصب حرك الطبق قليلاً وببطء للحصول على توزيع متجانس للوسط الغذائي

ملاحظة (Note) :- لاحظ أنه مادة الآكار المادة التي استعملت ليتصلب هذا الوسط سوف تصبح سائلة عندما نغليها وترجع لتتصلب عندما تصل درجة حرارتها إلى حوالي (٤٢ م).عدم تبريدها إلى حوالي (٥٠ م) قبل الصب سوف يؤدي إلى تكاثف البخار على غطاء الطبق من الداخل وبالتالي سوف تسقط هذه الرطوبة المتكونة على شكل قطرات على الوسط الغذائي بعد زراعة البكتريا , مما يؤدي إلى خلطها مع بعضها وبالتالي يتعذر الحصول على مزرعة نقية .

٤. خطط الطبقين كما موضح بالرسم مع إتباع شروط التعقيم باستخدام إبرة التلقيح
٥. كرر نفس العملية باستعمال الحليب الخام الحاوي على البكتريا المختلطة بعد رجه جيداً وباستعمال الطبق الثاني .

رابعاً : طريقة الأطباق المصبوبة (التخافيف المتسلسلة)

Pour Plate or Serial Dilutions Technique

الطريقة الثانية من الطرق الحصول على المزرعة نقية تتألف من تخفيف عقدة من البكتريا باستعمال ثلاثة أنابيب من الآكار المغذي (Nutrient Agar) الذائبة ومن ثم صب محتويات كل أنبوبة بطبق بتري المعقم وبالنتيجة سوف نحصل على طبق من هذه الأطباق حاوي على عدد قليل من المستعمرات المتفرقة عن بعضها. من فوائد هذه الطريقة أنها تحتاج إلى خبرة ومهارة أقل من الطريقة السابقة.

المواد اللازمة :-

- مزرعة مختلطة.
- ثلاثة أنابيب تحوي كل منها على الآكار المغذي (Nutrient Agar).
- ثلاثة أطباق بتري.
- مصباح بنزن.
- حمام مائي.
- إبرة تلقيح.

طريقة العمل :- Methodology

١. ضع أرقام (3 , 2 , 1) على كل من الأنابيب الثلاثة الحاوية على الآكار المغذي وضعها في بيكر من الماء وأغلي لتذويب الآكار . في نفس الوقت ضع أرقام (3 , 2 , 1) على أطباق بتري المعقمة من الأسفل (لا تفتحها)

٢. برد الآكار المغذي الذي أصبح سائلاً إلى درجة حرارة حوالي (٥٠ م) وضع الأنابيب في جهاز يعمل أيضاً كحمام مائي بحيث يمكن التحكم بدرجة حرارته وعند توفره .

٣. رج الأنبوبة الحاوية على المزرعة المختلطة من البكتريا بين راحتي اليدين ومن ثم لقح بأخذ عقدة منها باستعمال إبرة التلقيح المعقمة والمبردة قليلاً وضعها في الأنبوبة رقم (1) مراعياً شروط التعقيم عند فتح الأنبوبتين .

٤. رج الأنبوبة رقم (1) بين راحتي اليدين وخذ منها عقدة ولقح بها الأنبوبة رقم (2) مراعياً شروط التعقيم السابقة الذكر . رج الأنبوبة رقم (2) قبل إرجاعها إلى الحمام المائي الذي ثبتت درجة حرارته على (٥٠ م) لكي لا يتصلب الآكار .

٥. رج الأنبوبة رقم (2) جيداً وخذ منها عقدة ولقح الأنبوبة رقم (3) وأرجع الأنبوبة رقم (2) إلى الحمام المائي .

٦. رج الأنبوبة رقم (3) بين راحتي اليدين ومن ثم أسكب محتوياتها في طبق بتري رقم (3) بفتحه قليلاً لكي لا يتلوث . رج الأنبوبة رقم (1) و (2) وأسكب محتويات كل منهما في طبق بتي (1) و (2) على التوالي .

٧. بعد أن يتصلب الآكار ضع الأطباق الثلاثة في الحاضنة وبصورة مقلوبة وعى درجة حرارة (٣٧°م) ولمدة (٢٤ – ٤٨ ساعة) وبهذه الطريقة سوف نحصل على مستعمرات نقية يمكن تلقيح الـ (Agar Slants) التي حضرناها في الدرس العملي الثاني لكل مستعمرة نقية من هذه المستعمرات ولغرض دراسة صفاتها وخواصها الفسلجية وتصنيفها باستعمال (Berge's Manual of Determinative Bacteriology).

س/ تكلم عن طريقة الأطباق المصبوبة

عدد البكتريا في كل طبق نموذجية x مقلوب التخفيف 1/10

الدرس العملي السابع

عزل الفطريات

تقسم الفطريات بصورة عامة إلى قسمين أولهما العفن (Molds) الذي يكون متعدد الخلايا والثاني الخمائر (Yeasts) التي تكون وحيدة الخلية .

يتكون العفن من مجموعة من الخيوط تسمى (Hyphae مفرد و Mypha جمع) التي تتجمع مع بعضها لتكون جسم الفطر المسمى (Mycelium) وقد تكون الخيوط مقسمة (Septate) أو غير مقسمة (Aseptate) سوف نقوم بهذا الدرس بعزل الأعفان المختلفة من أماكن مختلفة بنفس الطريقة التي عزلنا بواسطتها البكتريا ولكن باستعمال وسط غذائي مختلف في تركيبه وكذلك مختلف في درجة تركيز أيون الهيدروجين (pH) حيث أن الفطريات تنمو بصورة أفضل في الوسط الحامضي بعكس البكتريا حيث أنها تفضل الوسط المتعادل كذلك سوف نقوم بدراسة الخميرة (خميرة الخبز) وصفات الوسط الغذائي المستعمل في عزل الأعفان .

يمكن استعمال أحد الوسطين التاليين :

1. Martins media

Peptone	5 g
Glucose	10 g
KH_2PO_4	1g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.5 g

2. Sabourouds media

Peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar – Agar	20 g
Distil Water	1000 ml
Rose Bengal	0.033 g
Agar – Agar	18 g
Distil Water	1000 ml

لوحظ أن الوسط الأول يحوي على مادة (Rose Bengal) التي تحفظ الحموضة الدرجة الملائمة لنمو الفطريات كذلك يحوي على (Streptomycin) تمنع نمو البكتريا أما الوسط الثاني فيحتاج إلى التعديل في درجة الحموضة إلى (pH 5.6) ليكون ملائم لنمو الفطريات .

يتم تعقيم كلا الوسطين على درجة (١٢١°م) وضغط (١٥ باوند / ١ أنج ^{٢}) ولمدة (٢٠ دقيقة) . بعد ذلك نصب الوسط في أطباق بتري المعقمة حوالي (١٥ مل) في كل طبق .

طريقة العمل :- Methodology

١. عرض الطبق الحاوي على (Martine media) لجو المختبر أو أي مكان تختاره وذلك بفتحه لمدة ساعتين بعدها يغلي ويترك في مكان دافئ لمدة (٤ – ٥ أيام). أو يجلب إلى المختبر لوضعه في الحاضنة على درجة حرارية ملائمة (٢٨ م) .

٢. بعد انتهاء المدة أدرس أولاً ألوان المستعمرات النامية من أعلى الطبق ومن الأسفل بالعين المجردة أو باستعمال الميكروسكوب قوة (10x) وسجل ملاحظاتك .

٣. أعمل تحضير رطب من كل مستعمرة من المستعمرات النامية (Wet mount) وذلك بالطريقة التالية : (أسأل الأستاذ لينتخب لك مستعمرات معينة) .

- ضع قطرة من محلول (Lactophemol cotton blue) أو محلول (Lactophe nol) فقط على السلايد .
- خذ جزء صغير جداً من العفن (مع قشط صغير جداً من سطح البيئة) باستعمال الإبرة المستقيمة المعقمة والملقط أو أي آلة يفترضها الأستاذ المختص وضعه على القطرة من المحلول وغط بغطاء السلايد (Cover slide) مع ملاحظة تجنب تكون فقاعات (أسأل الأستاذ عن كيفية ذلك) .
- أفحص تحت قوة (10x) ووضح الصورة .
- أفحص تحت قوة (40x) عند الحاجة (لا تستعمل العدسة الزيتية بتاتاً) .

٤. أستعن بالرسومات المرفقة للتعرف على جنس الفطر .

دراسة الخميرة :-

سوف ندرس خميرة الخبز كمثال (cerevisiae) .

ضع قطرتين من الخميرة السائلة على السلايد . غط بغطاء السلايد وأفحص تحت قوة (10x) أولاً ومن ثم على (40x) ولاحظ شكل الخميرة وأجزاءها الداخلية ومقارنتها مع البكتريا الكروية الشكل من الممكن عمل تحضير كما في البكتريا وصبغه ومن ثم فحصه تحت العدسة الزيتية (لاحظ تبرعم خلية الخميرة) .

الدرس العملي الثامن

تأثير العوامل الفيزيائية والكيميائية على نمو البكتريا

Effect of physical and chemical factored in groeth and survival of Bacteria

التجربة الأولى : ما هي العوامل الفيزيائية والكيميائية التي تؤثر على نمو البكتريا ؟

١- تأثير درجة الحرارة Effect of temperature

الحرارة هي إحدى العوامل المسببة التي تؤثر على حيوية وتكاثر البكتريا وبصورة خاصة تؤثر على نشاط أنزيمات الخلية . لكل بكتريا درجات حرارة (Maximum) (أعلى درجة حرارة ممكن أن تنمو عليها) ودرجات حرارة (Minimum) (أقل درجة حرارة ممكن أن تنمو عليها) ودرجات حرارة (Optimum) (الدرجة المثلى التي تنمو عليها) . لا يمكن للبكتريا أن تنمو في درجات حرارة أعلى من الـ (Maximum) أو أقل من الـ (Minimum) لأنه تحت هذه الظروف سوف تصبح أنزيمات الخلية غير نشطة (Inactive) في هذه التجربة سوف نقوم بدراسة تأثير درجات حرارية مختلفة على نمو البكتريا (Escherichia coli) والبكتريا (Bacillus subtilis) وهي (٥ , ٢٥ , ٣٨ , ٤٥ م) .
الهدف الرئيسي من التجربة هو تحديد الدرجة المثلى .

مواد التجربة :-

- مزرعة من بكتريا
- أنابيب تحوي على (Nutrient broth) معقمة عدد (١٠) أنابيب .
- إبرة تلقيح
- حاضنة بعدد (٤) .

طريقة العمل :- **Methodology**

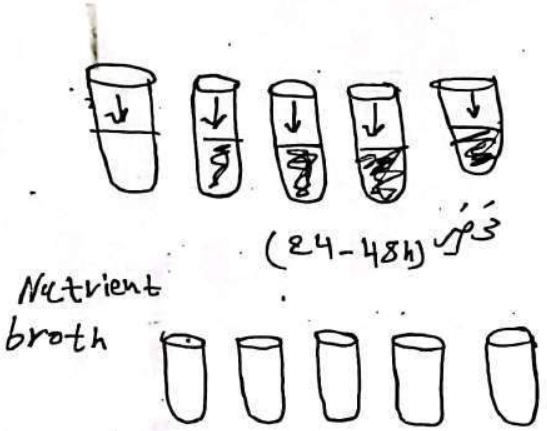
لكل بكتريا خمس أنابيب , أربعة تلقح وواحدة بدون تلقيح

١. ضع علامة على كل من الأربع أنابيب الحاوية على الوسط الغذائي تشير إلى درجات الحرارة المراد دراستها ولتكن (٥ , ٢٥ , ٣٨ , ٤٥ م) مع أسم البكتريا .
٢. لقح كل من الأربع أنابيب بالبكتريا (Escherichia coli) باستعمال إبرة التلقيح المعقمة تاركاً الأنبوبة الخامسة من دون تلقيح (Control) .
٣. كرر الخطوة رقم (١) والخطوة رقم (٢) على بكتريا (Bacillus subtilis) .
٤. ضع الأنابيب بالحاضنة وحسب الدرجة المطلوبة ولمدة (٢٤ – ٤٨) ساعة (أنبوبة المقارنة تترك جانباً لكي نستعملها مستقبلاً) .

٥. بعد انتهاء فترة التحضين قارن نمو البكتريا (**Escherichia coli**) على درجات الحرارة المختلفة وذلك بقياس درجة العكارة (Turbidity) بالعين المجردة أو باستعمال جهاز الـ (photo colorimeter) عند توفره بالمقارنة مع أنبوبة الـ (Control) . (لاحظ أنه كلما زادت عكارة الوسط كلما زاد نمو البكتريا) . طبق نفس العملية على بكتريا (**Escherichia coli**) .

٦. يمكن تسجيل النتائج بالطريقة التالية (لكل بكتريا ولكل درجة حرارة) .

لا يوجد نمو	none
نمو قليل	+
نمو أكثر	++
نمو كثير	+++



التجربة الثانية :

تأثير القاتل للحرارة Lethal effect temperature

الهدف من التجربة هو مقارنة درجة حساسية أجناس مختلفة من البكتريا للتغير في درجة الحرارة . هناك مصطلحان يجب معرفتهما قبل البدء بهذه التجربة .

- TDP Thermal Death Point وهي الحرارة التي تكفي لقتل البكتريا خلال مدة (١٠) دقائق .
- TDT Thermal Death Time وهو الوقت اللازم لقتل البكتريا أو السبورات على درجة حرارة معينة

في هذه التجربة سوف نقوم بتعويض البكتريا (Escherichia coli) على درجات حرارية مختلفة ولتكن (٦٠ , ٧٠ , ٨٠ , ٩٠ , ١٠٠ م) ولمدة زمنية مختلفة ولتكن (صفر , ١٠ , ٢٠ , ٣٠ , ٤٠) دقيقة بقصد التوصل إلى حساب الـ (TDP , TDT) .

لإجراء التجربة سوف نقوم أولاً بتثبيت درجة الحرارة وتغيير المدة الزمنية مثلاً نبدأ بدرجة حرارة (٦٠ م) مع الوقت (صفر , ١٠ , ٢٠ , ٣٠ , ٤٠) دقيقة وهكذا سوف نقوم بتثبيت المدة الزمنية وتغير درجة الحرارة وبنفس الطريقة .

مواد التجربة :-

لكل مجموعة ولكل نوع من البكتريا المواد دراستها

- أطباق بتري معقمة عدد ٥ .
- ماصات حجم (١ مل) عدد ٥ .
- فلاسك يحوي حوالي (٦٠ مل) من الوسط الغذائي (Nutrient Agar)
- مزرعة نقية من البكتريا (Escherichia coli) نامية في بيئة (Nutrient broth) وأنبوبة أخرى من دون بكتريا .
- حمام مائي .

طريقة العمل :- Methodology

١. أغلي الفلاسك الحاوي على البيئة إلى أن يذوب الآكار وبرده إلى (٥٠ م) بوضعه في حمام مائي ودرجة حرارته مثبتة على (٥٠ م) لكي لا يتصلب .
٢. ضع علامة واضحة على الخمسة أطباق بتري المعقمة تشير إلى المدة الزمنية (صفر , ١٠ , ٢٠ , ٣٠ , ٤٠ ,) دقيقة مع أسم البكتريا ولنبدأ بـ (E. coli) .
٣. رج المزرعة البكتيرية جيدا وأنقل منها (٠،١ مل) إلى طبق بتري المعقم (صفر) مستعملا ماصة معقمة .
٤. ضع المزرعة البكتيرية أو أنبوبة الـ (Nutrient Agar) " من دون البكتريا " في حمام مائي وضع محرار في أنبوبة البيئة الخالية من البكتريا سخن إلى أن تصل درجة الحرارة إلى (٦٠ م)

ثبتها على ذلك أحسب بعدها مدة (١٠) دقائق ومن ثم أنقل (٠،١ مل) من المزرعة إلى طبق بتري (١٠)دقيقة باستعمال ماصة جديدة معقمة .

٥. استمر بالتسخين على درجة (٦٠°م) ورج المزرعة وأنقل (٠،١ مل) إلى طبق بتري (٢٠) دقيقة وهكذا أعلى (٣٠ و ٤٠ دقيقة) " استعمل ماصة جيدة في كل مرحلة ورج المزرعة جيدا قبل التلقيح " .

٦. أضف الوسط الغذائي (Nutrient Agar) إلى كل من الأطباق الخمسة (حوالي ١٥ مل لكل طبق) وحرك الطبق ببطء على شكل رقم (8) لخلط المحتويات مع البيئة .

٧. كرر نفس الخطوات السابقة على البكتريا (B. subtilis) .

٨. الخطوات من (١) إلى (٨) كانت لدراسة تأثير مدة زمنية مختلفة على درجة حرارة ثابتة (٦٠°م). الآن يمكن أن نكررها ولكن بتغير درجة الحرارة إلى (٧٠°م) ومن ثم إلى (٨٠ , ٩٠ , ١٠٠°م) لكل من البكتريا .

٩. حضن جميع الأطباق بصورة مقلوبة على درجة حرارة (٣٧°م) ولمدة (٢٤ ـ ٤٨ ساعة) . أفحص بعد ذلك نمو كل من البكتريا في كل طبق وسجل النتيجة واحسب من هذه المعلومات كل من (TDT , TDP)

التجربة الثالثة :

تأثير الضغط الأوزموزي Osmotic Pressure and Bacteria Growth

يتأثر نمو البكتريا بكمية الماء التي تدخل وتخرج من الخلية . فإذا نمت الخلية في وسط غذائي يحوي كمية قليلة من المواد الذائبة (NaCL) مثلاً (Hypotonic) سوف لا تتأثر ولكن تتأثر كثيراً إذا نمت في وسط غذائي يحوي كمية كبيرة من المواد الذائبة (Hypotonic) لان ذلك سوف يؤثر تأثيراً مباشراً على كمية الماء الذي يدخل أو يخرج من الخلية وبالتالي فزيادة نسبة المواد الذائبة سوف يقلل من الماء الذي يدخل إلى داخل الخلية وبالتالي جفاف السايتوبلازم وتصبح الخلية (Plasmolyzed coli) مما يؤدي إلى موت الخلية . في هذه التجربة سوف نقوم بتلقيح أجناس مختلفة من البكتريا على أوساط غذائية تحوي تركيزات مختلفة من ملح الطعام (NaCL) والتي سوف تحضن على درجة حرارة ملائمة ولمدة (٤٨) ساعة بعدها نلاحظ الاختلاف في نمو كل بكتريا في التراكيز المختلفة .

مواد التجربة :-

- أربع أطباق بتري تحوي (Nutrient Agar) بتراكيز مختلفة من ملح الطعام ولتكن (٠،٥ و ٥ و ١٠ و ١٥ %) في كل طبق .
- مزرعة نقية من البكتريا المراد دراستها ولتكن (B. subtilis , E. coli)
- مزرعة مجهولة .

طريقة العمل :- Methodology

في كل طبق من التراكيز المختلفة سوف نلقح الثلاث أجناس من البكتريا وذلك كما يأتي :

١. سجل على الجهة العليا من أسفل الطبق (في كل تركيز) أسم البكتريا (E. coli) وفي الوسط (B. subtilis) وفي أسفل البكتريا المجهولة .
٢. لقح كل طبق من الأطباق الأربعة بكل من البكتريا وحسب موقعها وذلك بأخذ عقدة من المزرعة (E. coli) وعمل خط منها في الجهة العليا من الطبق ومن ثم تعقيم إبرة التلقيح وأخذ عقدة من المزرعة (B. subtilis) وعمل خط تلقيحي منها في الوسط بعدها تعقم إبرة التلقيح وتؤخذ عقدة من المزرعة المجهولة وعمل خط تلقيحي منها في الأسفل . كرر نفس العملية في الأطباق الأربعة .
٣. حضن جميع الأطباق على درجة حرارة (٣٧° م) ولمدة (٤٨ ساعة) . سجل النتيجة وذلك بتقدير نمو كل من البكتريا في كل تركيز من التراكيز الأربعة .

التجربة الرابعة :

تأثير الـ pH على نمو البكتريا pH and Bacteria Growth

تؤثر درجة تركيز أيون الهيدروجين في الوسط المحيط بالبكتريا ($pH = \log 1/H^+$) تأثيراً مباشراً على نمو ونشاط الأنزيمات المختلفة وبالتالي على نمو وتكاثر الخلية نفسها وبصورة غير مباشرة . لكل نوع من الأنواع المختلفة للبكتريا (pH) مثلى تنمو عليها وزيادة أو نقصان الـ (pH) عن ذلك الحد سوف يؤثر على أعدادها وذلك عندما تكون العوامل الأخرى التي درسناها ثابتة .

في هذه التجربة سوف ندرس تأثير تركيزات مختلفة من أيون الهيدروجين في الوسط الغذائي على نمو وتكاثر البكتريا (B. subtilis) أو أي بكتريا أخرى .

مواد التجربة :-

- ستة أنابيب تحوي (Nutrient Agar) ذو pH مختلفة . (pH_4 , pH_5 , pH_6 , pH_7 , pH_8 , pH_9) .
- مزرعة نقية من البكتريا (B. subtilis) .

طريقة العمل :- Methodology

١. لقح كل أنبوبة من أنابيب الوسط الغذائي المختلفة الـ (pH) بعقدة من المزرعة البكتيرية باستعمال إبرة التلقيح .
٢. حضن الأنابيب على درجة حرارة (٣٧ م) ولمدة (٤٨ ساعة) .
٣. بعدها لاحظ درجة تعكير الوسط بالعين المجردة أو باستعمال جهاز الـ (Phothcolorimeter) عند توفره.

ملاحظة (Note) :- كلما زادت درجة التعكير كلما كان النمو أكثر .

X الرضا للامتحان النهائي

التجربة الخامسة :

تأثير الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Light Bacterial Growth

كل بكتريا (عدا التي تقوم بعملية التركيب الضوئي) تتأثر بالأشعة فوق البنفسجية الموجودة في ضوء الشمس التي تبلغ أطوال موجاتها الضوئية بين (٢٠٠ – ٤٠٠٠ انكستروم) وأكثر تأثير يكون تحت الـ (٢٦٥٠ انكستروم) (انكستروم (A) = ١٠ - ٨ من السنتمتر) . في هذه التجربة سوف نلقح أطباق بتري الحاوية على الوسط الغذائي بالبكتريا المراد دراستها ومن ثم تعريض الأطباق للأشعة فوق البنفسجية (من مصباح زئبقي) لمدة مختلفة وذلك بهدف حساب أقل مدة تكفي لقتل البكتريا جميعها . سوف نستعمل في هذه التجربة نوعين من البكتريا مكونة للسبورات (E. coli) وغير مكونة للسبورات (B. subtilis) وذلك للمقارنة بين مقاومة الخلايا الخضرية والخلايا السبورية للأشعة .

مواد التجربة :- لكل مجموعة ولكل بكتريا

- أطباق بتري حاوية على (Nutrient Agar) عدد (٥) .
- مصباح (U.V.) .
- ساعة توقيت .
- مزرعة نقية من (E. coli و B. subtilis) .

طريقة العمل :- **Methodology**

١. خطط سطح الوسط الغذائي بصورة كاملة بالبكتريا (E. coli) في كل من الخمسة أطباق باستعمال إبرة التلقيح .
٢. ضع طبق بتري من دون الغطاء الزجاجي مع تغطية نصف الطبق بقطعة من الكارتون (لمقارنة الجزء المعرض للأشعة مع غير المعرض) تحت مصباح الـ (U.V.) لمدة (٣٠ ثانية) بعدها غط بالغطاء الزجاجي ثانية . كرر نفس العملية في الطبق الثاني ولكن لمدة (٦٠ ثانية) والثالث لمدة (١٢٠ ثانية) والرابع (٢٤٠ ثانية) والخامس (٤٨٠ ثانية) (لا تنظر إلى الأشعة بصورة مباشرة) .
٣. كرر نفس العملية (خطوة ٢) بالنسبة للبكتريا (B. subtilis) .
٤. ضع جميع أطباق بتري في الحاضنة بصورة مقلوبة على درجة (٣٧ م) ولمدة (٤٨ ساعة) بعدها سجل نتيجة التجربة وأحسب أقل مدة زمنية كافية للقضاء على البكتريا .

التجربة السادسة :

تأثير الضادات الثقيلة Oligodynamic Action

يسمى التأثير القاتل للمعادن الثقيلة (Oligodynamic) ويكون ذلك نتيجة التفاعل مع بروتين الخلية مما يؤدي إلى موتها . في هذه التجربة سوف ندرس تأثير ثلاثة أنواع من المعادن الثقيلة على نمو وتكاثر البكتريا (E. coli) وهي (Cu^{++} , Ag^{+} , Al^{++}) وسوف نستعمل قطع النقود , الفضة , والألمنيوم كمصدر لهذه المعادن على التوالي .

مواد التجربة :-

- طبق بتري معقم .
- أنبوبة (Nutrient Agar pour)
- ملقط .
- صباح بنزن .
- ماء معقم .
- أقراص من النحاس (الفلس) والفضة والألمنيوم .
- كحول محمض (3% acid alcohol).
- مزرعة نقية من البكتريا (E. coli) أو أي بكتريا أخرى .

طريقة العمل :- Methodology

١. أذب أنبوبة الـ (Nutrient Agar pour) في حمام مائي وبرد على درجة (٥٠°م) ولقح بعقدة من البكتريا (E. coli) باستعمال إبرة تلقيح معقمة رج جيداً .
٢. مباشرة بعد الرج أسكب نصف محتوى الأنبوبة في طبق بتري المعقم وأحتفظ بالنصف الثاني في حمام مائي على درجة (٥٠°م) .
٣. نظف القطع المعدنية بالماء والصابون ومن ثم الماء بعدها أغمس كل قطعة بالكحول المحمض ومن ثم في الماء المقطر المعقم . ضع القطع فوق الآكار في الطبق مستعملاً ملقط معقم على مصباح بنزن
٤. أضف النصف الثاني من الأنبوبة (الملقح) فوق القطع المعدنية وضع الطبق بالحاضنة على درجة (٣٧°م) لمدة (٤٨ ساعة) بعدها قارن وقس قطر المنطقة الخالية من النمو حول كل قطعة من القطع المعدنية (Zone of Inhibition)

التجربة السابعة :

حساسية البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity

إن التقدم الطبي في المعالجات الطبية للإصابات البكتيرية خلال الثلاثين عاماً الماضية نتج باستعمال المضادات الحيوية التي تقتل أو توقف نشاط البكتريا (Bacteriostatio of Bactericidal) إن أكثر الأمثلة شيوعاً هو استعمال البنسلين المنتج من قبل الفطر (Penicillium) (عفن الخبز) الذي يعتبر قات للبكتريا كنتيجة لمنع نمو وتكوين غلاف الخلية .

بالنظر لعدم إمكانية استعمال مضاد واحد ضد كل الأنواع المختلفة من البكتريا لذلك وعندما يشك الطبيب في إصابة بكتيرية كمسبب لمرض معين يقوم بعزل البكتريا المسببة ويدرس حساسيتها لمجموعة كبيرة من الـ (antibiotic) بهدف اختيار أحسن مضاد يقضي على البكتريا المسببة .

بقد وجد في التجربة أنه قسم من البكتريا مثل (staphylococcus aurous) يمكنها أن تقاوم المضادات الشائعة الاستعمال من خلال الطفرات التي أخذناها في الدروس النظرية .

في هذا الدرس سوف نقوم بدراسة مجموعة من الـ (.antibiotics) على نمو كل من البكتريا (E. coli و Staphylococcus faecalis)

مواد التجربة :-

- أطباق بتري تحوي (Nutrient Agar) .
- أقراص (Antibiotics)
- ملقط
- مزارع نقية من البكتريا (E. coli و Staphylococcus faecalis) . نامية على (Nutrient Broth)

طريقة العمل :- Methodology

١. ضع (٠،١ مل) من المزرعة (E. coli) على سطح البيئة في طبق بتري الأول مستعملاً ماصة معقمة وأنشرها بصورة جيدة مستعملاً قضيب زجاجي على شكل حرف L (يعقم بغمسه بالكحول ومن ثم حرق الكحول على مصباح بنزن وتبريده). بنفس الطريقة لقح الطبق الثاني بالبكتريا الأخرى
٢. بعد (٥ دقائق) ضع مستعملاً ملقط معقم أقراص المضادات الحيوية المراد دراستها على سطح البيئة في كل طبق . استعمل إبرة التلقيح المعقمة لضغط كل قرص قليلاً داخل الوسط الغذائي .
٣. حضن الأطباق على درجة (٣٧°م) لمدة (٤٨ ساعة) أو إلى نهاية الأسبوع القادم . بعدها قس قطر المنطقة الخالية من النمو حول القرص وقارن بين الأقراص المختلفة وتأثيرها على نمو كل من البكتريا . أهمل المستعمرات الصغيرة جداً إذا وجدت حول القرص في المنطقة الخالية من النمو أما المستعمرات الكبيرة فإنها تعتبر بكتريا مقارنة لذلك المضاد .

أقراص المضادات الحيوية المستعملة وتسميتها :

Ampicillin	10 mog	AM – 10
Aureomycin	30 mog	A – 30
Erythromycin	15 mog	E – 15
Penicillin	10 unite	P – 10
Polymyxin B	50 unite	PB – 50
Streptomycin	10 mog	S – 10
Tetracycline	30 mog	Te – 30

التجربة الثامنة :-

Antiseptics – evaluation

المصطلح (Antiseptics) يعني أي مادة تمنع نمو وتكاثر الكائنات الدقيقة ولكن ليس من الضروري أن تقضي عليها بقتلها . بهذا التعريف يمكن القول بأنه الـ (Antiseptics) هو نفسه الـ (Bacteriaostatic) وهو أيضاً نفس (disinfectant) .

في هذه التجربة سوف نستعمل طريقة ورق الترشيح التي قطرها حوالي (٢/١ أنج) في تقييم بعض المواد الكيمياوية التي تعتبر (antiseptics) وذلك بغمس ورقة الترشيح بالمحلول الكيمياوي ووضعها على سطح البيئة الملقحة المراد دراستها ومن ثم تحضين الأطباق على درجة حرارة ملائمة لمدة (٤٨ ساعة) وبعدها نقيس قطر المنطقة الخالية من النمو حول كل قرص من هذه الأقراص .

مواد التجربة :- لكل مجموعة ولكل بكتريا .

- ثلاثة أنابيب (Nutrient Agar pour) .
- ثلاثة أطباق بتري معقمة (طبق لكل مادة كيمياوية مستعملة) .
- أوراق ترشيح قطر كل منها (٢/١ أنج) معقمة في طبق بتري .
- ملقط .
- مصباح بنزن
- محاليل كيمياوية في دوارق

(5% Phenol , 5% Formaldehyde , 5% Aquae's iodine)

- مزرعة نقية من (E. coli) نامية على (Nutrient broth)

طريقة العمل :- Methodology

١. أذب أنابيب الـ (Agar pour) في حمام مائي وبردها إلى (٥٠°م) . (ثبت درجة حرارة الحمام المائي على ٥٠°م) .
٢. ضع علامة على كل طبق من الأطباق الثلاثة (من الأسفل) مبيناً أسم البكتريا والمادة الكيمياوية المستعملة .
٣. لقح كل أنبوبة من الـ (Agar pour) المبردة إلى (٥٠°م) بعقدة من البكتريا (E. coli) . رج جيداً وأسكب محتويات كل أنبوبة في كل من الثلاثة أطباق المعقمة .
٤. بعد تصلب البيئة خذ قرص من أقراص أوراق الترشيح المعقمة مستعملاً ملقط معقم و أغمسه بالكحول الكيمياوي الأول وضعه في وسط البيئة في طبق بتري الخاص بذل المحلول الكيمياوي , أضغط قليلاً لتثبيت القرص مستعملاً إبرة تلقيح معقمة أو ملقط معقم . كرر نفس العملية بالنسبة للمحاليل الكيمياوية الأخرى .
٥. حضن على درجة (٣٧°م) لمدة (٤٨ ساعة) . قس بعدها قطر المنطقة الخالية من النمو وذلك من حافة القرص إلى حافة النمو بين تأثير المواد الكيمياوية المختلفة على نمو هذه البكتريا .

الدرس العملي التاسع (الخواص الفسلجية للبكتريا)

Physiological Properties of Bacteria

يعتمد علم تصنيف البكتريا على الدراسات المورفولوجية للخلية والمزرعة البكتيرية ودراسات أخرى فسلجية مكملة لها .

لقد تم في الدروس الماضية شرح قسم كبير من الدراسات المورفولوجية والتي منها أشكال ونظم تجمع الخلايا البكتيرية و تصبيغ البكتريا , حركة البكتريا , تكوين السبورات ..... الخ إضافة إلى شرحنا بعض الخواص المزرعية لتلك البكتريا .

لا يمكن الاعتماد فقط على الصفات المورفولوجية لمعرفة جنس البكتريا ويجب إجراء دراسات أخرى فسلجية . نظراً لكثرة أعداد هذه الدراسات ولضيق الوقت سوف نقوم بشرح قسم منها بهدف تدريب الطالب على كيفية الدخول إلى هذا العلم الواسع علماً بأنه جميع الدراسات متشابهة تقريباً والاختلاف فقط هو الهدف من إجراء تلك الدراسة والوسط الغذائي اللازم . قبل الدخول في التجارب المختبرية يجب فهم بعض المصطلحات المهمة .

Bi oxidation :- وهي التفاعلات الحيوية التي تحتاج إلى أنزيمات ومن دون هذه الأنزيمات لا يمكن للتفاعل أن يستمر وتنقسم إلى قسمين :

القسم الأول : **Respiration** وهي عملية التنفس التي تحصل بواسطتها البكتريا على الطاقة (تحت الظروف الهوائية) يكون الناتج النهائي غاز ثاني أوكسيد الكاربون (CO_2) فأثناء حرق الكلوكوز مثلاً من قبل بكتريا هوائية إجبارية سوف يتكون عدد كبير من الالكترونات التي تنتقل من موكب إلى آخر وبالأخير إلى الأوكسجين التكوين الماء وأثناء هذا الانتقال سوف تتولد الطاقة بوجود عدد من السايتوكرومات.

القسم الثاني **Fermentation** وهي عملية التخمر التي تحصل بواسطتها البكتريا على الطاقة أيضا ولكن تحت الظروف اللاهوائية . ويكون الناتج النهائي في هذه الحالة حامض أو كحول أو استالديهايد (Acetaldehyde) إضافة إلى بعض الغازات مثل (CO_2 و CH_4) أو الهيدروجين . فأثناء تخمر الكلوكوز من قبل بكتريا لاهوائية إجبارية مثلاً سوف تنتقل الالكترونات المتكونة من مركب عضوي إلى مركب عضوي آخر لعدم وجود الأوكسجين ولعدم وجود السايتوكرومات .

أما بالنسبة للبكتريا الاختيارية فإنه يمكنها القيام بكلتا العمليتين إما بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid Bacteria) فإنها تقوم بعملية التخمر وإنتاج اللاكتيك حتى بوجود الأوكسجين هناك ستة تفاعلات مهمة يمكن دراستها وهي :

١. تخمر الكاربوهيدرات باستعمال أنبوبة درهم (Durham Tube)
٢. تخمر إنتاج الحامض المختلط (Mixed acid Fermentation)
٣. تخمر البيوتانيديول (Butanediol Fermentation)
٤. إنتاج إنزيم الكاتاليس (Catalans Production)