

المادة: احياء مجهرية عملي

الفصل : الاول

المرحلة: الثانية

قسم: علوم الاغذية

اعداد: م.م سيف علي محمد

الدرس العملي الاول:-

المجهر:- Microscope

هناك عدة انواع من الميكروسكوبات منها المجهر البسيط والمجهر المركب (المجهر الالكتروني). ويعتبر الميكروسكوب من الاجهزة المهمة التي يجب ان تتوفر في مختبر الاحياء المجهرية حيث يساعد على دراسة الكائنات الدقيقة من الناحية التشريحية او العددية.

الهدف من الدرس:-

معرفة اجزاء الميكروسكوب وكيفية استعماله.

يتكون الميكروسكوب من مجموعتين رئيسيتين هما:-

اولا:- المجموعة الالية :- Mechanical parts والتي تتكون من الاجزاء التالية :-

- ١- قاعدة الميكروسكوب.
- ٢- الحامل :- الذي يتركب على القاعدة.
- ٣- الذراع:- والتي يحمل بواسطتها الميكروسكوب وهي توجد في اسفل الحامل .
- ٤- المسرح :- حيث توضع الشريحة المراد فحصها عليه ويوجد في اعلى الحامل.
- ٥- الانبوبة او الانبوب :- وتحمل في اعلاها العدسة العينية او العدستان العينيتان وتحمل في اسفلها العدسة الشيئية التي تكون مركبة عليها.
- ٦- القطعة الاتقية:- والتي يمكن تحريكها حركة دائرية للانتقال من عدسة الى اخرى وهي تتركب على الذراع.
- ٧- المنظم الكبير(التقليدي)وهو يوجد على الذراع.
- ٨- المنظم الصغير (الدقيق).

يستعمل المنظم الكبير في رفع انبوبة الميكروسكوب وخفضها بحركة سريعة نسبيا انا المنظم الدقيق فيحرك الانبوبة حركة بطيئة نسبيا.

ثانيا:- المجموعة البصرية Optical parts وتتكون من :-

- ١- العدسة العينية ووظيفتها تكبير صورة الجسم المرئي الحقيقية الناتجة من العدسة الشيئية وتكون قوة تكبيره ١٠ مرات .
- ٢- العدسة الشيئية:-وهي عادة تكون ثلاث عدسات وظيفتها تكوين صورة حقيقية معكوسة ومكبرة داخل جزء الانبوبة العلوي وتكون قوة تكبير العدسة الصغيرة ١٠ مرات وبعدها البوري ٦١ ملم والعدسة الكبرا الجافة قوة تكبيرها ٤٠ مرة وبعدها البوري من ٢,٣-٤ ملم والعدسة الكبيرة الزيتية تكون قوة تكبيرها ١٠٠ مرة وبعدها البوري ١,٨ ملم والتي يجب عند استعمالها استخدام قطرة من الزيت من نوع زيت السيدر التي تغمر بها العدسة وتسمى بالعدسة الزيتية المنغمسة.

فائدة زيت السيدر:- يمنع تشتت الضوء القادم من المصباح الى العدسة ويراعى انه كلما زادت قوة تكبير العدسة المنغمسة كلما قلت المسافة بينها وبين الجسم المرئي.

٣- المكثف:- يستخدم في تجميع الحزم الضوئية القادمة من المصباح الى داخل العدسة ويمكن تعديل كمية الضوء التي تسقط الى العدسة بتحريك المكثف الى الاعلى او الاسفل .

٤- الحجاب:- ويكون مركب في اسفل المكثف ويمكن قفله او فتحه للتحكم بكمية الضوء الذي يصل الى العدسة .

طريقة الفحص بالميكروسكوب المركب:-

١- يتم تشغيل المصباح الكهربائي للحصول على اكبر كمية من الضوء في المجال الميكروسكوبي . وتتم هذه العملية كما يلي :-

أ- رفع المكثف الى اعلى ما يمكن.

ب- يفتح الحجاب على اخره.

ت- نستخدم العدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير ١٠ مرات الى ان نحصل على اكبر كمية من الاضاءة.

٢- يوضع السلايد او الشريحة الحاوية على الخلايا المراد فحصها على المسرح ثم يستخدم المنظم الكبير لتحريك الشريحة الى الاعلى او الاسفل الى ان نرى اثار الصبغة.

٣- ننقل الى العدسة الزيتية الكبرى التي قوة تكبيرها ١٠٠ مرة مع وضع قطعة من زيت السيدر على الشريحة ثم نغمس العدسة بالزيت ثم نقوم بتحريك المنظم الدقيق الى ان نحصل على الصورة للخلايا الموجودة على السلايد .

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الميكروسكوب :-

١- يجب التأكد من نظافة العدسات والمكثف قبل البدء بالعمل .

٢- يجب عدم لمس العدسات باصابع اليد.

٣- عدم تحريك العدسات من مكانها.

٤- في حالة استخدام العدسة الزيتية المنغمسة وعند الانتهاء من استخدامها يجب ازالة الزيت المتبقي على العدسة باستخدام اوراق تنظيف العدسات المبللة بالزايولول لان ترك العدسة دون تنظيف يؤدي الى التصاق الزيت عليها مما يؤدي الى تجمع الاتربة عليها وتخدشها اما عند تنظيفها فلا يحصل تخدش للعدسة ولا تتجمع عليها الاوساخ وفي حالة عدم توفر هذا النوع من الورق فمن الممكن استخدام ورق لف السكائر للتنظيف ولا يجوز اطلاقا استخدام القطن او الكلينكس في تنظيف العدسات لان هذا سوف يؤدي الى تخدش العدسات وتلفها وذلك لانها سوف تترك الياف رفيعة على العدسة مما يؤدي الى تلفها.

٥- يحمل الميكروسكوب من الحامل بيد وتوضع اليد الاخرى اسفل الميكروسكوب عند نقله من مكان الى اخر مع ملاحظة تغطيته بغطاء بلاستيكي قبل وضعه بالصندوق.

تركيب المجهر الضوئي المركب



Photo: Jamil.F.Jaber

الدرس العملي الثاني :-**تصبغ البكتريا :- Staining of bacteria**

الغرض من الدرس هو دراسة اشكال وتجمعات البكتريا بعد صبغها بإحدى الصبغات الخاصة وانه هناك اكثر من طريقة لتصبغ البكتريا.

١ - التصبغ البسيط:- Simple staining

يتم هذا النوع من التصبغ باستخدام صبغة واحدة فقط.

الغرض من التجربة:- التدريب على كيفية استخدام الميكروسكوب في فحص السلايدات المصبوغة بهذه الطريقة وقبل اجراء عملية التصبغ سواء كان تصبغ بسيط او باي طريقة اخرى فيجب تحضير ما يسمى بالغشاء البكتيري ويكون من المهم جدا معرفة تحضير هذا الغشاء وتثبيتته على الشريحة.

طريقة العمل:-

- ١- تغسل الشريحة المستعملة بالماء والصابون ثم تغمر بالكحول ومن ثم تمرر على اللهب لحرق الكحول بهدف تعقيم الشريحة الزجاجية ثم تبرد قبل الاستعمال مع ملاحظة اذا كانت الشريحة جديدة فانها لا تحتاج الى هذه الخطوات .
- ٢- تعقم ابرة التلقيح (اللوب) على لهب مصباح بنزن ثم تترك لتبرد قبل ان تؤخذ مسحة من المزرعة النقية المراد فحصها بعد ان تخرج بشكل جيد اذا كانت المزرعة سائلة مع مراعات ظروف التعقيم . اما اذا كانت المزرعة المراد فحصها صلبة فتؤخذ قطرة من ماء الحنفية بواسطة ابرة التلقيح المعقمة وتوضع على الشريحة ثم تؤخذ جزء من المزرعة الصلبة وتمزج مع قطرة الماء وتنتشر على مساحة ١ سم^٢ ثم تترك لتجف بهواء المختبر للحصول على غشاء رقيق.
- ٣- بعد جفاف الغشاء تمرر الشريحة على اللهب من ٥-٦ مرات والغرض من هذه العملية هي قتل الخلايا البكتيرية والعمل على التصاقها على الشريحة وهي ما يسمى بتثبيت الغشاء البكتيري.
- ٤- بعد ذلك يكون الغشاء جاهز للتصبغ. لحد هذه النقطة تسمى العملية بتحضير الغشاء البكتيري.

التصبغ البسيط:-

تتم باستخدام صبغة واحدة وعادة ما تستخدم صبغة ازرق المثلين (مثيلين بلو) او باستخدام صبغة السفرائين. وان طريقة التصبغ هي:-

- ١- يغمر الغشاء بهذه الصبغة ويترك لمدة ٤٥ ثانية.

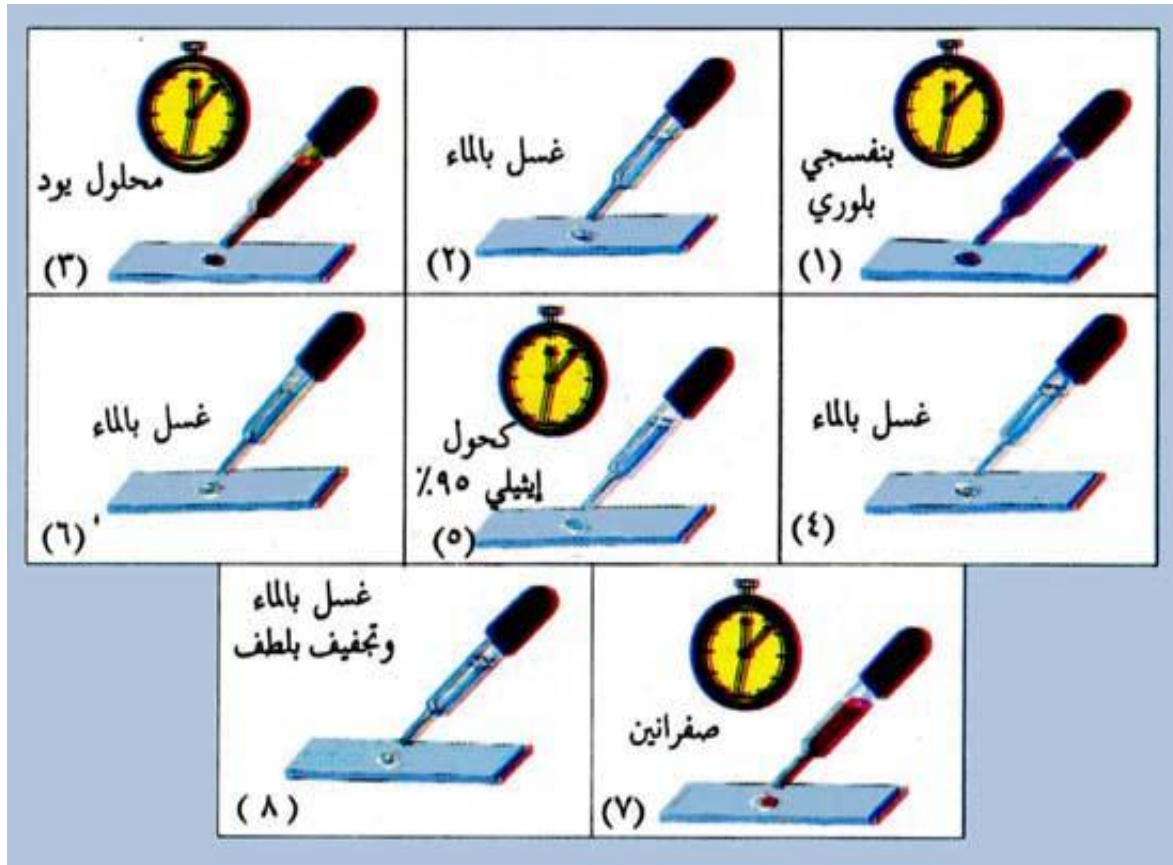
- ٢- يتم التخلص من الزائد من الصبغة في حوض الصبغ او على المغسل وذلك باستخدام تيار هادئ من ماء الحنفية ثم بعد ذلك يجفف السلايد بواسطة ورق نشاف.
- ٣- يكون السلايد جاهز للفحص بواسطة الميكروسكوب حيث يتم الفحص اولا بالعدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير ١٠ مرات . وباستخدام المنظم التقليدي يتم تحريك السلايد الى الاعلى حتى يتم ملاحظة اثار العينة ثم بعد ذلك نوضع قطرة من الزيت على السلايد ثم ننتقل للفحص بالعدسة الشيئية المنغمسة وباستخدام المنظم الصغير يتم تحريك السلايد الى ان نحصل على اوضح صورة للخلايا الموجودة على السلايد.

التصبغ بطريقة كرام:- Grams staining

ابتكرت هذه الطريقة من قبل العالم كرام عام ١٨٨٤ م والتي على اساسها تقسم البكتريا الى قسمين هما :-

- ١- البكتريا الموجبة لصبغة كرام G^+ والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي.
- ٢- البكتريا السالبة لصبغة كرام G^- والتي تفقد صبغة الجنسيان البنفسجي وتعود وتنصبغ بصبغة السفرانين الحمراء وتظهر تحت المجهر باللون الاحمر.

وقبل الضافة الكحول يجب استعمال محلول اليود الذي يعمل على تثبيت الصبغة البنفسجي حيث يتحد اليود مع الصبغة مكون معقد الجنسيان - اليود الذي يترسب على جدار الخلية البكتيرية ويكون من الصعب ازالته في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما في البكتريا السالبة لصبغة كرام يسهل ازلتها .



التفسير العلمى:- لطريقة كرام لصبغ البكتريا:-

ان الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام يكون حاوي على نسبة دهن اكبر مما في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام لذلك فانه عند اضافة الكحول فانه سيعمل على ازالة الدهن الموجود في الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام مما يؤدي الى حدوث ثقب في جدار الخلية البكتيرية اي ان المركب المعقد الجنسيان – اليود ينمن ان يزال عند اضافة الكحول فتصبح البكتريا عديمة اللون وتكون جاهزة للاصطباغ بصبغة السفرانين الحمراء اللون . بينما البكتريا الموجبة لصبغة كرام يكون جدارها حاوي على نسبة دهن قليلة ولذلك فانه تحتفظ بالمعقد الجنسيان – اليود لذلك تحتفظ بلونها البنفسجي.

طريقة العمل:-

- ١- يحضر الغشاء يحضر الغشاءي للبكتريا المراد اختبارها ويثبت على اللهب .
- ٢- يغمر الغشاء بصبغة الجنسيان البنفسجي لمدة ٤٥ ثانية ثم بعد ذلك نتخلص من الزائد من الصبغة بغسلها بتيار من ماء الحنفية الهادئ .
- ٣- نغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة ٤٥ ثانية فيتحد مع صبغة الجنسيان البنفسجي مكون معقد ثم بعد ذلك نغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية .
- ٤- يغمر الغشاء بالكحول لمدة ٢٠ ثانية ويفضل اضافة الكحول على شكل قطرات الى ان يصبح لون الكحول المزال بنفسي فاتح وعلى ان لا تزيد الفترة عن ٢٠ ثانية ثم يغسل بماء الحنفية .
- ٥- يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء ولمدة ٣٠ ثانية ومن ثم يتم التخلص من الصبغة الزائدة بغسلها بماء الحنفية .
- ٦- يجفف السلايد بورق النشاف .
- ٧- يفحص السلايد بالميكروسكوب باستخدام العدسة الشيئية الصغرى الى ان نلاحظ اثار الصبغة ثم ننقل بالفحص بالعدسة الزيتية الكبرى مع استخدام قطرة الزيت وباستخدام المنظم الدقيق الى ان نشاهد البكتريا بوضوح وبذلك نرسم شكل البكتريا .

المرحلة الثانية / علوم الاغذية

مبادئ احياء مجهرية عملي

الدرس العملي الثالث:-

التصبغ بطريقة Acid fast bacteria

يتم تصنيف البكتريا على اساس هذه الطريقة من التصبغ الى قسمين هما :-

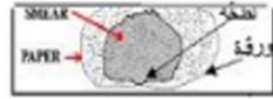
- ١- بكتريا صامدة للاحماض:- والتي سوف تنصبغ بصبغة الكاربون الحمراء Carbon fuchsin حيث تحتفظ هذه البكتريا بالصبغة ويكون من الصعب ازلتها من الخلية البكتيرية فتظهر تحت المجهر باللون الاحمر.
- ٢- بكتريا غير صامدة للاحماض:- تنصبغ البكتريا بهذه الصبغة ايضا لكنها تفقدها عند استخدام الكحول وتعود فتصبغ بصبغة ازرق المثيلين زرقاء اللون وتستخدم الحرارة كعامل مساعد على ادخال الصبغة الى داخل الخلية البكتيرية التي تكون حاوية على نسبة عالية من الشموع.

في حالة البكتريا الصامدة للاحماض والتي تكون من الصعوبة ازلتها عند استخدام الكحول بعكس النوع الثاني التي يكون من السهل ازالة الصبغة الحمراء عند استخدام الكحول ثم تعود البكتريا وتنصبغ بصبغة ازرق المثيلين الزرقاء اللون .

ان لهذه الطريقة بعض التطبيقات في مجال الطب حيث تستخدم في تصبغ البكتريا المسببة لمرض السل *Mycobacterium tuberculosis* والتي هي من نوع Acid fast bacteria

طريقة العمل :-

- ١- يحضر غشاء من البكتريا المراد فحصها ويثبت على اللهب .
- ٢- يوضع على حمام مائي في بيكر يحتوي على ماء حار ثم يغمر الغشاء بصبغة Carbon fuchsin ونستمر بالتسخين لمدة ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك باضافة الصبغة باستمرار لان جفاف الغشاء قد يؤدي الى ازالته .
- ٣- يبرد الغشاء ثم يغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية للتخلص من الزائد من الصبغة .
- ٤- يغسل الغشاء باضافة الكحول المحمض الذي يضاف على شكل قطرات او باستخدام ماصة او بغمر الغشاء بالكحول لمدة ٢٠-٣٠ ثانية ثم يغسل بماء الحنفية للتخلص من الكحول الزائد.
- ٥- يغمر الغشاء بصبغة ازرق المثيلين لمدة ٤٥ ثانية ثم نتخلص من الزائد من الصبغة بغسله بتيار من ماء الحنفية .
- ٦- يجفف السلايد بورق النشاف .
- ٧- يفحص بالمجهر باستخدام العدسة الشيئية الصغرى اولا ثم ننقل بالفحص باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة مع وضع قطرة من زيت السيدر.



تبره الشريحة لمدة دقيقة واحدة

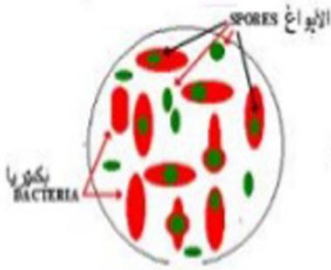
التخلص من ورقة الترشيح
والغسل بماء نظيفة

صنعة الشرائح
COUNTER
STAIN



غسل الشريحة مع تجفيفها بورق منديل

الكشف بالمجهر



الدرس العملي الرابع:-تصبغ السبورات:- Spores staining

بعض انواع البكتريا وخاصة البكتريا التابعة لجنس Bacillus و لجنس Clostridium يكون لها القابلية على مقاومة الظروف غير الطبيعية عن طريق تغيير شكلها من الخلية الخضرية الى ما يسمى بالسبور الداخلي Endo spore وقد وجد ان بعض السبورات ممكن ان تبقى حية في ماء مغلي لمدة ٢-٣ ساعة بالاضافة الى مقاومة السبورات لبعض المواد الكيميائية والتي تستخدم في القضاء على الخلايا الخضرية ولا يمكن صبغ السبورات بالاضافة الاعتيادية الا اذا استخدمنا الحرارة كعامل مساعد اذ يعمل على نفاذ الصبغة الى داخل الخلية السبورية .
و اذا ما صبغت السبورات فانه يكون من الصعب جدا ازالة الصبغة منها .

هناك عدة طرق لصبغ السبورات وان من اكثر هذه الطرق شيوعا هو استخدام صبغة اخضر الملاكات Malachite Green لصبغ السبورات ويتم استعمال صبغة السفرانين Safranin لصبغ الخلايا الخضرية او الجزء الخضري من الخلية في حالة كون الخلية لازالت في طور التحول من خلية خضرية الى سبور وعند الفحص تحت المجهر سوف نشاهد خلايا خضرية كاملة تتصبغ باللون الاحمر وسبورات يكون لونها اخضر بالاضافة الى وجود خلايا في طور التحول مصبوغة باللون الاحمر والاخضر .

طريقة العمل :-

- ١- يحضر غشاء من المزرعة البكتيرية المراد فحصها وتثبت على اللهب مع ملاحظة ان المزرعة المفحوصة او المستخدمة يجب ان لا يزيد عمرها عن ٢٤-٤٨ ساعة .
- ٢- يوضع السلايد على حمام مائي في بيكر ثم يغمر الغشاء بصبغة اخضر الملاكايت ونستمر بالتسخين لمدة ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك باضافة الصبغة بشكل مستمر لان عملية الجفاف تؤدي الى تلف الغشاء.
- ٣- يبرد السلايد ثم يغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية .
- ٤- يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء لمدة ٤٥ ثانية ثم يزال الزائد من الصبغة ويغسل بتيار من ماء الحنفية ثم يجفف الغشاء بواسطة ورق النشاف .
- ٥- يفحص السلايد تحت الميكروسكوب باستخدام العدسة الشيئية الصغرى ثم بالعدسة الزيتية المنغمسة مع اضافة قطرة من الزيتونلاحظ اشكال والوان الخلايا والسبورات التي سوف تظهر تحت المجهر .



شكل (53) لاحظ DNA محاط بغلاف البوغ. ويظهر البوغ داخل الخلية الخضرية وسوف تفقد الخلية جزء الخضري منها مع مرور الوقت

الدرس العملي الخامس:-

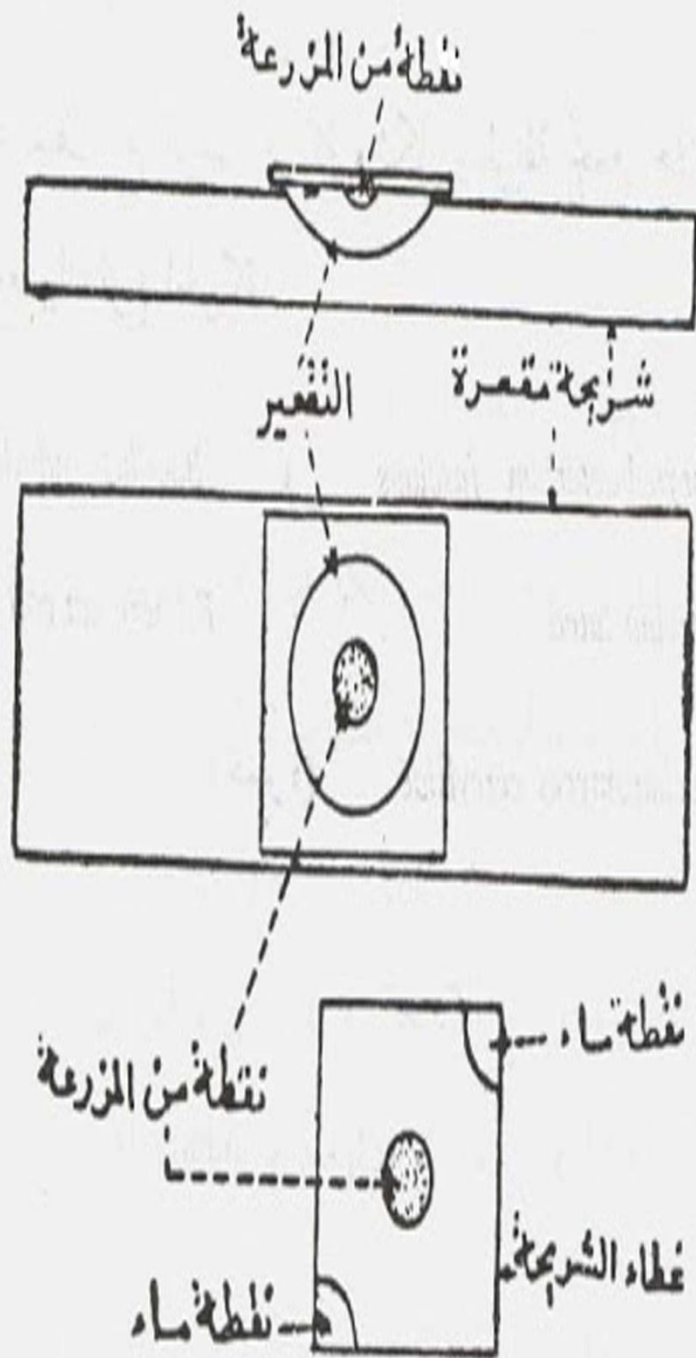
فحص حركة البكتريا بواسطة القطرة المعلقة:-

تكون البكتريا اما متحركة وتسمى Mobile او غير متحركة وتسمى Non mobile.

تتم حركة البكتريا بواسطة الاسواط Flagella اما البكتريا غير المتحركة فتظهر ساكنة عند فحصها بالمجهر وقد تظهر مهتزة دون ان تنتقل من مكانها وتكون هذه الحركة الاهتزازية ناتجة عن حركة الجزيئات الموجودة في البكتريا وتسمى هذه الحركة بالحركة البراونية . وتظهر حركة البكتريا في المزارع السائلة الحديثة والتي لا يزيد عمرها عن ٢٤-٤٨ ساعة.

طريقة العمل :-

- ١- بواسطة ابرة التلقيح المعقمة يؤخذ ٤ قطرات صغيرة جدا من ماء الحنفية وتوضع في الاركان الاربعة لغطاء السلايد Cover slide الذي يكون موضوع على المنضدة .
- ٢- تؤخذ عقدة من المزرعة المراد فحصها وتوضع في وسط غطاء السلايد .
- ٣- يؤخذ السلايد المقعر بحيث يكون التقعر الى الاسفل ويوضع على غطاء السلايد باحتراس وانتباه شديدين بحيث تكون القطرة في وسط التقعر . فائدة قطرة الماء تعمل على التصاق غطاء السلايد بالسلايد.
- ٤- يقلب ببطئ وعناية بحيث تكون القطرة معلقة في وسط الغطاء.
- ٥- يفحص السلايد بالمجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم تنتقل بالفحص بالعدسة الجافة الكبرى ذات قوة التكبير ٤٠ مرة مع تقليل الاضاءة لمشاهدة حركة البكتريا اذا كانت متحركة او ملاحظة سكونها اذا كانت ساكنة (غير متحركة) .



تحضير النقطة المعلقة .

الدرس العملي السادس:-طرق عد البكتريا :-أ- طريقة العد الميكروسكوبى المباشر:-

تستخدم هذه الطريقة في حساب اعداد البكتريا في عينة من الحليب الخام لمعرفة جودة هذا الحليب ونوعيته ومدى تلوثه بالاحياء المجهرية او البكتريا وتتم هذه الطريقة بوضع كمية معروفة الحجم من الحليب والتي هي ٠,٠١ مل من الحليب والتي تفرش على مساحة معلومة من السلايد او الشريحة والتي هي ١ سم^٢ بالضبط ومن ثم يفحص السلايد تحت المجهر ويتم عد الخلايا البكتيرية الموجودة في المجال الميكروسكوبى الواحد والذي هو جزء من السلايد الذي يمكن رؤيته في الميكروسكوب . وبطريقة حسابية بسيطة يمكن معرفة اعداد البكتريا الموجودة في حجم معين من الحليب وذلك لحساب مساحة المجال الميكروسكوبى الواحد ثم حساب عدد المجالات الموجودة في ١ سم^٢ ثم يضرب عدد البكتريا الموجود في المجال الواحد في عدد المجالات ونستخرج عدد البكتريا الموجودة في عينة الحليب وهي ٠,٠١ مل والمفروشة على مساحة ١ سم^٢ ثم يضرب الرقم الاخر في ١٠٠ لكي نستخرج عدد البكتريا الموجودة في ١ مل من الحليب.

طريقة العمل :-

- ١- نوضع السلايد الاعتيادي على ورقة خطوط بيانية او ورقة مربعات ثم يتم رسم ١ سم^٢ من جهتي السلايد اي في الوسط بالضبط.
- ٢- تغسل الماصة من الداخل عدة مرات بالحليب وذلك لسحب كمية معينة من الحليب ومن ثم نفخه وبعدها نأخذ ٠,٠١ مل من الحليب ونشرها على ١ سم^٢ بالضبط بعد ان ترج العينة حوالي ٢٠ مرة قبل اخذها لكي يحصل تجانس للحليب وكذلك يتم توزيع الخلايا البكتيرية في الحليب .
- ٣- يترك السلايد ليحجف في هواء المختبر ثم توضع على حمام مائي لمدة ٥ دقائق وذلك كتنبيت الغشاء .
- ٤- يرفع السلايد من الحمام المائي ويضاف اليه قطرات من الزايلول Xylool للتخلص من الدهن الموجود في العينة .
- ٥- يصبغ السلايد بصبغة ازرق المثيلين لمدة نصف دقيقة ثم يتم التخلص من الزائد من الصبغة بغسلها بتيار هادئ من ماء الحنفية.
- ٦- يغسل السلايد بالكحول وذلك لازالة الصبغة الزائدة ثم يغسل بالماء .
- ٧- ايتترك السلايد ليحجف في هواء المختبر ثم يفحص بالميكروسكوب باستخدام العدسة الصغرى ثم نضع قطرة من الزيت وننتقل بالفحص بالعدسة الزيتية الكبرى .بعد ذلك يمكن حساب عدد البكتريا الموجودة في ١ مل من الحليب .

كيفية حساب مساحة المجال الميكروسكوبي:-

يتم استخدام شريحة ميكرومتريّة Stage micrometer حيث تكون هذه الشريحة مقسمة الى عدد من الخطوط وان المسافة بين خط وخط هي ١٠ مايكرون . توضع الشريحة تحت العدسة الزيتية ويتم حساب عدد الخطوط التي تظهر تحت المجهر وهي ١٦ خط في المجال الميكروسكوبي الواحد.

مساحة المجال الميكروسكوبي الواحد (مساحة الدائرة) = نق^٢ × ط

حيث ان قطر الدائرة سوف يكون ١٦ × ١٠ = ١٦٠

وان نصف القطر هو ٨٠

مساحة المجال الميكروسكوبي (مساحة الدائرة) = ٣,١٤ × ٨٠ × ٨٠ = ٢٠٠٠٠ مساحة المجال الواحد

هناك عدة مجالات في ال سم^٢ الواحد

مساحة المربع ١ سم^٢ ١٠٠٠٠ × ١٠٠٠٠

عدد المجالات = $\frac{10000 \times 10000}{20000} = \frac{100000000}{20000} = 5000$ = مساحة المجال الواحد ٢٠٠٠٠

عدد الخلايا البكتيرية في المجال الميكروسكوبي

ناخذ عدد من المجالات والتي يجب ان لا تقل عن ١٠ مجالات وليكن ١٥ مجال حيث يتم اخذ اعداد البكتيريا في هذه المجالات ولتكن ١٥٠٠ خلية بكتيرية ثم ناخذ متوسط هذه الاعداد وذلك بقسمة عدد البكتيريا على عدد المجالات التي تم قراءة اعداد البكتيريا فيها وهي ١٥٠٠ ÷ ١٠٠ = ١٥ خلية بكتيرية

نضرب متوسط عدد البكتيريا × عدد المجالات الكلية ينتج عدد البكتيريا في ٠,٠١ مل المستخدمة في الفحص وكما يلي :-

١٠٠ × ٥٠٠٠ = ٥٠٠٠٠٠ خلية في عدد المجالات الكلي والموجودة في ٠,٠١ مل حليب

١٠٠ × ٥٠٠٠٠٠ = ٥٠٠٠٠٠٠٠٠ عدد الخلايا في ١ مل حليب

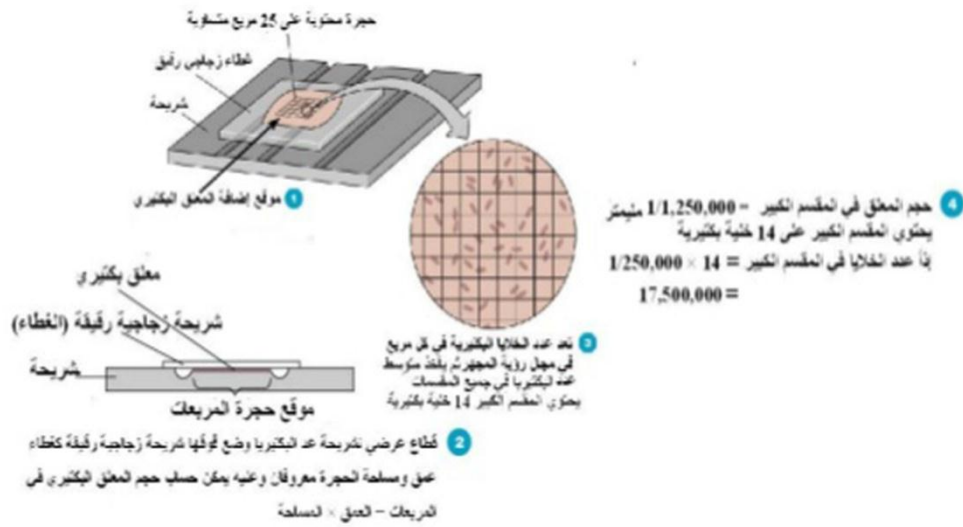
عيوب الطريقة:-

تعطي اعداد من البكتيريا اكثر من الحقيقة لانها تعد الخلايا الحية والميته معا .

محاسن الطريقة :-

تعتبر طريقة سهلة وسريعة ولا تحتاج الى اجهزة معقدة .

- قياس النمو بحساب عدد الخلايا الكلي
- يمكن حساب عدد الخلايا مباشرة باستعمال شريحة خاصة تحتوي في منتصفها حجرة مقسمة إلى مربعات متساوية في المساحة (شكل 42)



شكل (42) خطوات طريقة المباشرة لحساب عدد الخلايا الكلية

الدرس العملي السابع:-ب- عد البكتريا بطريقة الاطباق المصبوبة:-

تستخدم هذه الطريقة في عد الخلايا الحية فقط باستعمال وسط غذائي لتنمية البكتريا حيث يتم في هذه الطريقة اجراء سلسلة من التخفيفات للحليب والتي هي عبارة عن انايبب اختبار تحتوي على ٩ مل من الماء المقطر المعقم او قناني تحتوي على ٩٩ مل من الماء المقطر المعقم وبعد اجراء التخفيفات المطلوبة ينقل ١ مل من العينة المخففة الى كل طبق من اطباق بتري المعقمة ثم يصب الوسط الغذائي المرق المغذي N.A في الطبق ويترك ليتصلب ومن ثم تنقل الاطباق الى الحاضنة وتوضع بشكل مقلوب وتترك لتنمو المستعمرات البكتيرية عليه ولفترة زمنية معينة وعلى درجة حرارية معينة وبعد ذلك يتم عد المستعمرات النامية في الطبق والتي هي نفس عدد الخلايا البكتيرية التي كانت موجودة في العينة (١ مل) من التخفيف . بعد ذلك تضرب عدد المستعمرات x مقلوب التخفيف لكي نحصل على عدد البكتريا في (١ مل) من العينة الاصلية من دون التخفيف .

هناك طريقة اخرى تقع ضمن الاطباق المصبوبة تسمى طريقة الاطباق المصبوبة مسبقا وهي كما يلي :-

يؤخذ طبق بتري معقم ويصب بداخله الوسط الغذائي ويترك ليتصلب ثم يؤخذ حجم معين من العينة والتي هي ٠,١ مل من العينة المخففة وتفرش على سطح الاكار المتصلب ثم تنقل الاطباق الى الحاضنة بعد وضعها بشكل مقلوب وتترك لمدة ٢٤ ساعة ثم يتم حساب عدد المستعمرات النامية على سطح الاكار فتمثل اعداد البكتريا الموجودة في ٠,١ مل من العينة المخففة ويضرب هذا العدد x ١٠ ليمثل اعداد البكتريا الموجودة في ١ مل من العينة المخففة ومن ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف ليمثل اعداد البكتريا في ١ مل من العينة الاصلية.

طريقة العمل :-

١- يحضر الوسط الغذائي N.A ويعقم في الاوتوكليف ويوضع في حمام مائي على درجة ٥٠م لحين استخدامه.

٢- يرج الحليب المراد عد البكتريا فيه بشكل جيد ليتم توزيع البكتريا فيه بشكل جيد ثم يؤخذ ١ مل منه ويضاف الى انبوبة اختبار حاوية على ٩ مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف ١/١٠ وبعد ان يتم رج الانبوبة هذه بشكل جيد يؤخذ منها ١ مل ويضاف الى انبوبة اختبار اخرى حاوية على ٩ مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف ١/١٠٠ ونستمر باجراء التخفيفات الى ان نصل الى التخفيف ١/١٠٠٠٠٠.

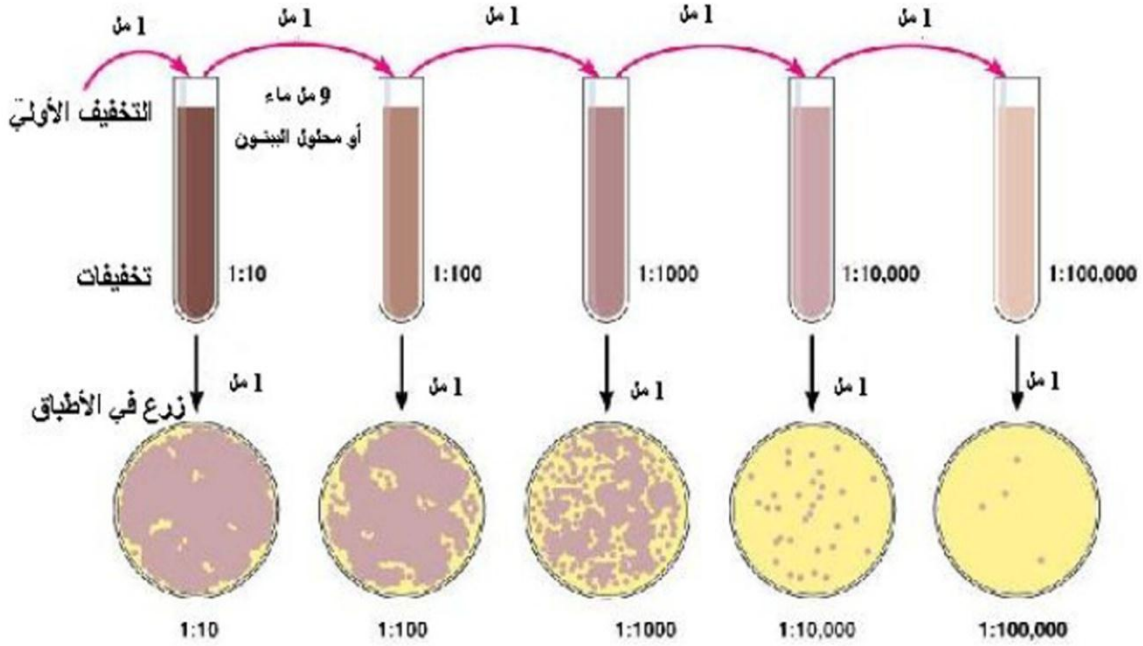
٣- يؤخذ ١ مل من اخر تخفيفين وتنقل الى اطباق بتري معقمة ويصب عليها الوسط الغذائي الموجود في الحمام المائي على ٥٠ م ويحرك الطبق بشكل الرقم ثمانية ليتم مزج العينة

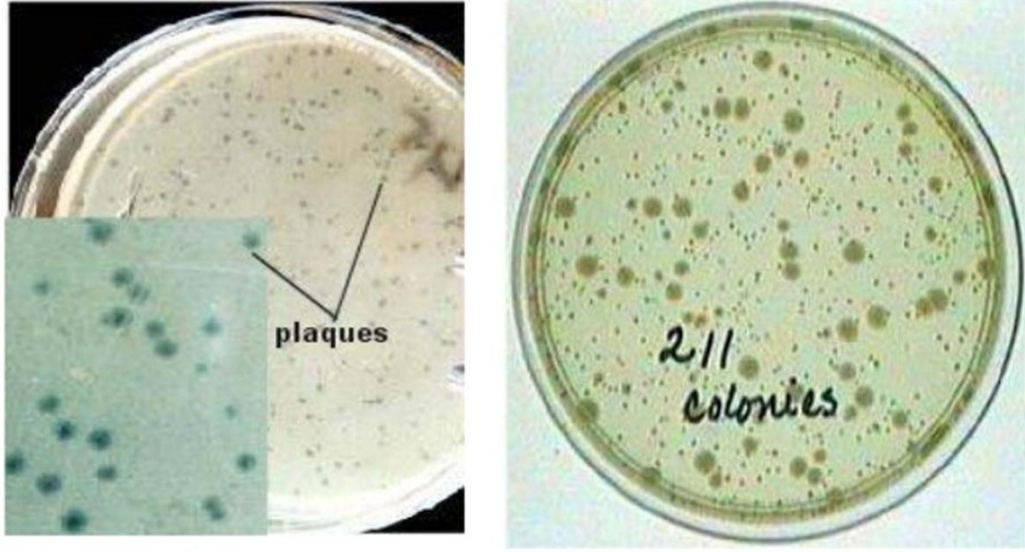
مع الوسط الغذائي ثم تترك الاطباق ليتصلب الوسط الغذائي وتنقل الى الحاضنة وتوضع بشكل مقلوب على ٣٥ م لمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة .
٤- تعد المستعمرات النامية والتي تكون بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف فنحصل على اعداد البكتريا الموجودة في ١ مل من الحليب .

من محاسن هذه الطريقة هي عد الخلايا الحية فقط .

ملاحظة:-

تضع الاطباق في الحاضنة بشكل مقلوب لكي لا تتكون قطرات من البخار والتي سوف تتكثف وتتحول الى ماء وتسقط على سطح الاكار مما يؤدي الى صعوبة عد المستعمرات الموجودة على سطح الاكار .





شكل (39) يوضح نمو البكتيريا أو الفيروسات على بيئة
ملانمة لكل منهما

الدرس العملي الثامن:-طرق التعقيم:-

يتم من خلالها تعقيم الادوات والمواد التي نستخدمها من زجاجيات واجهزة ومواد اخرى لانها تكون معرضة للتلوث بالهواء الجوي الحاوي على جميع الميكروبات بصورة مباشرة او غير مباشرة .

وهناك عدة انواع من طرق التعقيم منها:-

١- **التعقيم باستخدام افران الهواء الساخن:-** حيث ترتفع درجة حرارة الهواء كهربائيا او غازيا الى ١٦٠-١٨٠م وتترك الادوات في الفرن من ٢-٣ ساعة حيث يتم قتل الاحياء المجهرية نتيجة التغير السريع الذي يطرأ على خلاياها وكذلك نتيجة اكسدة محتويات الخلية وتتبع هذه الطريقة لتعقيم الادوات والزجاجيات مثل الماصات واطباق بتري والدوارق وانايبب الاختبار حيث توضع الاطباق والماصات في علب خاصة من الحديد غير قابل للصدأ وتوضع في داخل فرن الهواء .

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند اجراء هذه الطريقة:-

- أ- يجب ان تكون الادوات الزجاجية غير مبللة بالماء.
- ب- اذا كانت الزجاجيات او الادوات مغطاة بورق او مسدودة بسدادات قطنية يجب ان لا تزيد درجة الحرارة عن ١٦٠م.
- ت- يجب وضع الادوات بشكل مرتب في داخل الجهاز قبل التسخين.
- ث- وضع الادوات في داخل الجهاز بطريقة تسمح بمرور تيارات الهواء الساخنة من خلالها.
- ج- يتم حساب الوقت اللازم للتعقيم بعد وصول درجة الحرارة الى الدرجة المطلوبة.
- ح- عدم فتح الجهاز الا بعد انخفاض درجة الحرارة الى درجة حرارة مقاربة لدرجة حرارة الجو.

٢- **التهب المباشر:-** يستخدم مصباح بنزن في تعقيم ابر التلقيح Loop التي تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة حيث تستخدم هذه الابر في نقل المزارع الى الاوساط الغذائية او زراعتها بطريقة التخطيط للحصول على مزارع نقية او لنقل مزرعة بكتيرية لعمل شريحة زجاجية لفحصها تحت المجهر.

٣- **التلهيب الكحولي :- Alcohol flaming** يستخدم لتعقيم المشارط والسكاكين والهاون الخزفي وذلك بغمرها بكحول الايثانول ثم حرقها بالتهب المباشر فيشتعل ما علق بها من الكحول ويعمل على قتل الاحياء المجهرية .

٤- **التعقيم بالبخار المتقطع (معقم ارنولد):** - عبارة عن وعاء معدني (بشكل فرن الهواء الساخن) مبطن بطبقة عازلة للحرارة ذو رفوف مثقبة لتسهيل تسريب البخار الى كل اجزاء الجهاز وله فتحة من قمته يوضع بها محرار لقياس درجة الحرارة داخل جهاز التعقيم فيتم التعقيم في هذا النوع على ثلاث فترات في ثلاثة ايام متتالية ويعرف التعقيم في هذه الحالة بالتعقيم المتقطع وان الفكرة الاساسية في التعقيم المتقطع هو ان الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية النابتة تهلك عندما تتعرض لبخار الماء (١٠٠م) لمدة نصف ساعة اما الجراثيم الداخلية الناضجة غير النابتة فانها تقاوم هذه الحرارة حتى لو تعرضت لها لمدة طويلة تصل لعدة ساعات وكذلك ترك البيئة بالحضان الو بالغرفة لمدة ٢٤ ساعة يسمح للجراثيم المقاومة للحرارة بان تنبت وتتحول الى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم في اليوم التالي تعقم بهذه الطريقة المواد التي تتلف او تتغير خواصها الطبيعية والكيميائية عند تسخينها الى درجة حرارة اعلى من ١٠٠م مثل بيبات الحليب والجيلاتين المغذي والبيئات المحتوية على بعض السكريات

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل جهاز ارنولد:-

- أ- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار.
- ب- يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد وصول درجة الحرارة الى ١٠٠م وليس من بدأ تشغيل الجهاز.
- ت- اخراج البيئات من الجهاز بعد انتهاء المدة اللازمة مباشرة.
- ث- يجب ان تكون المادة المعقمة مادة غذائية ا وان تكون السدادة تسمح بمرور البخار الى الداخل مثل القطن الطبي.
- ٥- **التعقيم بالبخار تحت الضغط (الايوتوكليف):** - يستغل بخار الماء في الاوتوكليف لان زيادة الضغط في داخل الجهاز تزيد من حرارة التعقيم حيث ان فاعلية الاوتوكليف في التعقيم ترجع الى الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط ويجب ان يصل البخار الى اجزاء المادة المراد تعقيمها فان لم يصل البخار الى تلك المادة فان عملية التعقيم لا تخرج عن كونها عملية للتعقيم الحراري على ١٢١م لمدة ربع ساعة الامر الذي لا يكفي للتعقيم حتى بالحرارة الجافة ويحدث هذا اذا اقفلت الاوعية بسدادات شديدة الاحكام (سدادات مطاطية) او قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكميات الكبيرة من التربة لعدم وصول البخار اليها ولهذا يستخدم القطن في سد الاوعية اثناء تعقيم المواد لانه مسامي يسمح بمرور البخار من خلاله لان الحرارة الرطبة لها تاثير اكبر في قتل الاحياء المجهرية من الحرارة الجافة . تعقم معظم الاوساط الغذائية والتي لا تتلف عند تعرضها الى درجات حرارة عالية اي اعلى من ١٠٠م ويستخدم الاوتوكليف ايضا في اتلاف المزارع البكتيرية المرضية او المزارع غير المرغوبة و المراد القضاء عليها.

تعتمد هذه الطريقة على توليد البخار بكمية كبيرة في اناء قوي الجدران مصنوع من الحديد غير قابل للصدأ او النحاس ويوجد في اسفل الجهاز سخان كهربائي وللجهاز غطاء يقفل باحكام شديد ولذلك فان زيادة البخار في داخل الجهاز يرفع من درجة الحرارة عن ١٠٠م ويرتفع الضغط طرديا مع زيادة كمية البخار حيث يقابل ذلك ارتفاع درجة غليان الماء .

يبين الجدول التالي علاقة الضغط بدرجة الحرارة والفترة اللازمة للتعقيم

<u>الضغط الجوي</u>	<u>درجة الحرارة</u>	<u>المدة اللازمة للتعقيم</u>
٠,٥ جوي	١١٣م	٣٠ دقيقة
١ جوي	١٢١م	١٥-٢٠ دقيقة
١,٥ جوي	١٢٨م	٥ دقائق
٢ جوي	١٣٤م	ثواني فقط

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الاوتوكليف:-

- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار المطلوب .
 - التأكد من ان البخار يملأ الجهاز تماما وحل محل الهواء في الجهاز.
 - يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد الوصول الى الضغط المطلوب
 - لا يفتح الجهاز الا بعد ان ينخفض الضغط داخل الجهاز الى الضغط الجوي العادي.
- ٦- التعقيم بواسطة الترشيح:-

بعض البيئات السائلة الحاوية على مواد تتلف بالحرارة كالفيتامينات والانزيمات والمضادات الحياتية وسيرم الدم والاحماض الامينية وسموم البكتريا يتم تعقيمها باستخدام مرشحات بكتريولوجية لها اقطار لا تسمح بمرور البكتريا من خلالها ما عدا الفايروسات . ومن هذه المرشحات:-

مرشح سايتز Seitz Filter:

ويتركب من قمع من المعدن الغير قابل للصدأ واقراص للترشيح المصنوعة من الاسبستوس او السليلوز او الاسبستيل سليلوز او مصنوع من الخزف غير المصقول او يكون مصنوع من الياف زجاجية متشابكة.

الاحتياطات التي تراعى عند التعقيم:-

- يجب تعقيم جهاز الترشيح بجميع ملحقاته بعد لفه بورق سميك مانع للرطوبة.
- يستخدم الضغط المخلخل (التفريغ) عند التعقيم بهذه الطريقة للاسراع من عملية الترشيح.
- يجب اختيار دقة السوائل المرشحة:- ويتم ذلك بتلقيح جزء من الراشح في بيئة قياسية وتحضينها على حرارة مناسبة . فاذا لم يظهر نمو في هذه البيئة فان ذلك يدل على دقة عملية التعقيم.
- بعد الانتهاء من عملية الترشيح تنظف المرشحات جيدا.

ترشيح الغازات :-

تحتاج بعض الاعمال الميكروبيولوجية الى تعقيم الغازات خاصة عند امرار هذه الغازات في المزارع الميكروبية مثل امرار الاوكسجين لتشجيع نمو الميكروبات الهوائية او تعقيم الهواء الداخلى الى غرف معقمة كما في معامل تعبئة الادوية حيث يجب ان يكون الهواء خالي من اي تلوث .

ترشح الغازات بتمريرها على طبقات سميكة من القطن المضغوط المعقم او باستعمال طرق اخرى .

العوامل الكيميائية Chemical factors

• تقسم المواد الكيميائية تبعاً لطريقة تأثير المواد الكيميائية على البكتريا:

- مواد موقفة للنمو Bacteriostatic agents
 - هي مواد مثبطة لنمو البكتريا ولا تقتلها
- مواد مبيدة Bactericidal agents:
 - هي مواد تحدث اضرارا بالغا بالبكتريا ويميتها

- تقسم المواد الكيميائية تبعاً لمكان تأثيرها:

- مواد كيميائية سطحية التأثير (تستخدم للتطهير)
- مواد كيميائية مستعملة لعلاج الامراض البكتيرية

اولاً: مواد كيميائية سطحية التأثير

تستخدم فى التطهير السطحى وقد يكون التطهير :

- **خارجى** (يشمل الجلد والاعشبة المخاطية) تسمى بالمطهرات الخارجية **Antiseptic** وهى تؤدى الى قتل البكتريا ولا تؤثر على الجلد والاعشبة المخاطية
- **سطحى** : تطهير المعامل والارضيات وادوات الجراحة تسمى المطهرت السطحية **Disinfectants** وهى تؤدى الى قتل البكتريا وتؤثر على الجلد والاعشبة المخاطية

امثلة لبعض المواد الكيميائية المستخدمة للتطهير

- **الفينول ومركباته :**
يستخدم كمحلول مائى بتركيز ٢-٥% لتعقيم الادوات والأجهزة والأسطح.
سام لترسيبه البروتينات الخلوية وإتلاف الغشاء البلازمى (يعود تأثيره الى تفاعل مجموعة OH مع مجاميع الامين الحرة لبروتينات الخلية ويكون بروتينات غير ذائبة فتموت الخلية).
- **الالدهيات :**
اهمها الفورمالدهيد (الفورمالين) فى صورة محلول مائى ٣٧%
سام لانه مختزل قوى يتحد مع الاحماض النووية والبروتينات الخلوية فينتلفها ويوقف نشاط الخلية بالإضافة لرائحته النفاذه.
- **الكحولات :**
اهمها الكحول الايثانول يستخدم بتركيز ٥٠-٧٠% .
المثانول سام ومهيج للعين لذا يندر استخدامه كمطهر.
الكحولات مذيبة للدهون ويرسبه بالإضافة لقدرته التجفيفية.

• الصابون

- هو ملح صوديومي او بوتاسيومي للحموض الدهنية ياتي تأثيره كمطهر من الازالة الميكانيكية للبكتريا، يقلل من التوتر السطحي للماء، يذيب الدهون والشحوم باستحلابها.

• المنظفات

- مواد ذات تركيب اكثر كفاءة في التطهير والتنظيف من الصابون، تقتل البكتريا منها :
 - منظفات تتاين وتظل الايونات ذات تاثير في التنظيف وتعرف بـ (الصابون الايوني) مثل سلفات لوريل الصوديوم.
 - منظفات تتاين وتظل الكاتيونات ذات تاثير في التنظيف وتعرف بـ (الصابون الكاتيوني) مثل ستيل بريد ثيم وهو اقوى من الاول.
 - منظفات لاتتاين ولاتبيد البكتريا.

مواد كيميائية مستعملة لعلاج الامراض البكتيرية

تستخدم للقضاء على البكتريا مثل مركبات السلفا والمضادات الحيوية ويشترط للمواد المستخدمة في العلاج أن:

- تكون قادرة على اباده الميكروب وعدم الاضرار بالعائل.
- يكون معدل امتصاصها بواسطة خلايا الطفيل اكبر من معدل امتصاصها بواسطة العائل.
- تكون عالية الثبات.
- لاتتدخل ولا تؤثر على مناعة جسم العائل.

الدرس العملى التاسع:-

الفحص الميكروبي للمياه:-

بالإضافة الى استخدام المياه العذبة النظيفة للشرب فهي ذاتها تاستخدم في تصنيع كثير من الاغذية فمثل هذه الاغذية يجب ان تكون نظيفة وخالية ليس من الميكروبات المرضية فحسب بل ومن الميكروبات التي تسبب الفساد للاغذية التي يدخل الماء في تصنيعها او تنظيفها.

ان تزايد استخدام الماء العذب واحيانا تبريده يقترن جنبا الى جنب الى تزايد المياه القذرة والملوثة من فضلات الانسان والحيوانات والصناعة التي غالبا ما ترمى في مصادر المياه العذبة كالانهار والبحيرات قبل معاملتها وتعقيمها . بذلك اصبحت المياه في الطبيعة اكثر تلوثا من السابق مما يتطلب معاملات تعقيمية اكثر فعالية للمياه التي تستخدم للشرب والصناعة .

ستقتصر هذه التجربة على بعض الاساليب المختبرية للفحص عن مدى نظافة ومحتوى الماء بالميكروبات ومدى صلاحيته للاستخدام في الشرب .

طريقة العمل:-

١- اخذ العينات:-

تؤخذ عينات من الماء بواسطة قنينة زجاجية معقمة بحيث تكون عينة الماء ممثلة بقدر على الثلج المجروش وينقل الى المختبر بالسرعة الممكنة وتجرى عليه الفحوصات الميكروبية مباشرة .

٢- تحضير العينات:-

قبل البدء في اجراء الفحص على عينات المياه مباشرة تخض القنينة التي تحتوي على عينة الماء ما لا يقل عن ٢٥ مرة ثم تجرى التخفيفات اللازمة (يعتمد ذلك على مدى تلوث الماء تحت الدراسة) ١/١ و ١٠٠/١ و ١٠٠٠/١ او اكثر ثم تخض التخفيف مباشرة قبل نقل الماء للزراعة جيدا ولغاية ٢٥ مرة.

٣- الفحص عن بكتريا القولون Coliform

أ- الفحص الاحتمالي:- Presumptive test

يوضع مقدار ١ سم^٣ من كل من الماء قيد الدراسة من التخفيف المعينة في انابيب تخمر fermentation tubes تحوي سائل اللاكتوز . تحضن الانابيب على درجة حرارة ٣٥م لمدة ٢٤ ساعة ثم يلاحظ تكون الغاز ام لا . اذ ان تكوين الغاز دليل على وجود مجموعة بكتريا القولون الاحتمالي . وتحضن الانابيب التي لم يتكون الغاز فيها لمدة ٢٤ ساعة اخرى فاذا تكون الغاز يكون دليلا ايضا على وجود بكتريا القولون . والانابيب التي لم يتكون بها الغاز يكون دليلا على عدم وجود بكتريا القولون فيها.

ب- الفحص التاكيدي:- Confirmed test

في هذا الفحص يستخدم احد الاوساط الغذائية التالية :- brilliant green lactose bile ، ENDO agar ، broth ، Eosin methylene blue (E M B) حيث تجرى عملية التلقيح التاكيدى على كافة الانابيب التي ظهر فيها غاز بعد ٢٤ ساعة في الفحص الاحتمالي اعلاه.

تجرى عملية التلقيح على السطح وبطريقة التخطيط Streak على الاوساط المتصلبة في اطباق بتري وتحضن على درجة حرارة ٣٥م لمدة ٢٤ ساعة ثم تفحص الاطباق عن وجود مستعمرات القولون المثالية Typical وبذلك يعتبر الفحص التاكيدى ايجابى واذا كانت اشكال المستعمرات غير مثالية يجرى الفحص التكميلي عليها .

ج- الفحص التكميلي:- Completed test

يختار عدة مستعمرات من بكتريا القولون المثالية وعدة مستعمرات غير مثالية من على الاوساط الغذائية في الفحص التاكيدى وتنقل المستعمرات على انفراد وتزرع في انابيب تخمر تحتوي على سكر اللاكتوز وعلى انابيب اختبار تحوي على الوسط الغذائى Nutrient agar بشكل مائل وبطريقة التخطيط Streak.

يفحص عن تكون الغاز في انابيب التخمر ومايكروسكوبيا بعد عملية التصيبغ بصبغة كرام .

فاذا تكون الغاز في انابيب التخمر وكان التصيبغ سلبى Gram negative وان البكتريا غير سبورية وذات شكل عصوي يعتبر دليلا مقنعا للفحص التكميلي على تواجد بكتريا القولون في عينة الماء تحت الدراسة.

٤- فعل البكتريا في المياه على حليب اللثموس :-

تلقح انبوبة تحوي على حليب اللثموس بمقدار ٠،١ مل من الماء قيد الدراسة ثم يحضن على درجة حرارة ٣٠-٣٢م لمدة ٢-٥ يوم ولاحظ تغير لون حليب اللثموس . اعمل شريحة من حليب اللثموس وافحصها مجهريا.

٥- العد البكتيري للماء :-

يوضع مقدار ٠،١ مل من الماء قيد الدراسة وتخفيفاته الملائمة في كل من اربع اطباق بتري .

يصب الوسط الغذائى Plate count agar .

يحضن طبقان من كل معاملة ذات اربع اطباق على درجة حرارة ٣٠-٣٢م لمدة يومين ويحضن الطبقان الاخران على درجة حرارة ٧م لمدة ١٠ ايام .

يلاحظ مستعمرات الميكروبات المختلفة النامية من الماء قيد الدراسة وتدرس اشكالها الظاهرية والفحص الميكروسكوبى لها.

الدرس العملي العاشر:-

الايوساط الغذائية:-

تقسم الاوساط الغذائية حسب قوامها الى قسمين رئيسيين هما :-

- ١- الاوساط الغذائية السائلة :- مثل المرق المغذي Nutrient broth
- ٢- الاوساط الغذائية الصلبة:- مثل الاكار المغذي Nutrient agar والتي لا تختلف في تركيبها عن الوسط السائل الا انه يضاف لها مادة الاكار Agar – Agar لتحويل الوسط من الحالة السائلة الى الحالة الصلبة وذلك لجعل البكتريا تنمو على شكل مستعمرات متفرقة على سطح صلب وكذلك للحصول على بكتريا بصورة نقية Pure culture .

وكذلك تقسم الاوساط الغذائية الى :-

- اوساط غذائية مركبة:- حيث يكون تركيبها معروف كما ونوعا وتسمى Synthetic media .
 - اوساط غذائية معقدة:- تكون غير معروفة التركيب الكيميائي وتسمى Synthetic media .Non-
- ومن الامثلة عليها:-

Synthetic media (مركبة)

١ غم $NaNO_3$

٠,٥ غم $MgSO_4$

٠,٠٣ غم $FeSO_4$

١ غم $NaCO_3$

١ غم K_2HPO_4

١٠٠٠ مل ماء مقطر

Non -Synthetic media (معقدة)

٣ غم Beef extraxt

٥ غم Pepton

١٠٠٠ مل ماء مقطر

انواع البكتريا بالنسبة لمصدر الكربون والطاقة:-

تقسم البكتريا بالنسبة لمصدر الكربون والطاقة الى قسمين:-

القسم الاول:- تستعمل ثاني اوكسيد الكربون كمصدر رئيسي للكربون واكسدة المواد المعدنية وكمصدر رئيسي للطاقة وتسمى ذاتية التغذية.

القسم الثاني :- تحتاج الى وجود مادة عضوية في الوسط الغذائي لكمي تستعمله كمصدر للكربون والطاقة وتسمى غير ذاتية التغذية وهي لا تستطيع ان تستفيد من غاز ثاني اوكسيد

الكربون الموجود بالجو بالرغم من توفره لها . حيث ان الوسط الغذائي التركيبي يكون ملائم للبكتريا ذاتية التغذية بينما الوسط الغذائي المعقد يكون ملائم للبكتريا غير ذاتية التغذية حيث وجود مستخلص اللحم يكون مصدر للكربون والطاقة اضافة الى مادة الليبتونالتي تستعمل كمصدر للنروجين.

البيئات الصلبة:-

استخدمت شرائح البطاطا قديما لتصليب الوسط الغذائي وبما ان البطاطا تعتبر مصدر جيد للكربون والطاقة لذلك فهي تستخدم من قبل معظم البكتريا او الفطريات وبذلك سوف يتحول الوسط الغذائي من سائل الى صلب بعد فترة قصيرة . لذلك استبدلت البطاطا بالجيلاتين حيث يعتبر الجيلاتين مصدر للطاقة والكربون لانه مادة بروتينية معقدة ناقصة لذلك وجد بان بعض انواع البكتريا المنتجة لانزيم الجيلاتينيز يمكن ان تحلله ويتحول الوسط الى سائل اضافة الى ان درجة انصهاره ٢٨م اي يتحول الوسط من الصلب الى السائل في ايام الصيف الاعتيادية ومن دون وجود اي نوع من البكتريا ويجب ان يضاف بنسبة عالية جدا قد تصل الى ١٥% من الوسط .

اما الان فيستخدم الوسط Agar-Agar الاكار- اكار وهي مادة كربوهيدراتية شديدة التعقيد تستخرج من بعض اعشاب البحر ولا يمكن لاي ميكروب من تحليلها وان درجة انصهارها ٩٦م اي ان الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة يبقى صلب ولا يتحول الى سائل الا عند درجة حرارة اكثر من ٩٦م وينجمد الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة تحت درجة حرارة ٤٢م اضافة الى انه يستعمل بنسبة اقل بكثير من استعمال الجيلاتين (١,٥-٢%) وفي حالة اذا كان هناك نوع من البكتريا يمكنها ان تحلله يجب في هذه الحالة استعمال السيليكا جيل Silica gel وعموما يستخدم اكار- اكار كمادة مصلبة في الاوساط الغذائية.

ومن اهم الفروقات بين مادتي الجيلاتين والاكار- اكار هي:-

الخواص	الاكار- اكار	الجيلاتين
نسبة اضافته الى البيئة	١,٥%	١٢-١٥%
تركيبه	مادة كربوهيدراتية شديدة التعقد تستخرج من بعض الاعشاب البحرية	مادة بروتينية معقدة ناقصة
درجة انصهاره	٩٦م	٢٨-٣٠م
درجة تجمده	٤٢م	تحت ٢٨م
مقدرة البكتريا على تحليله	جميع انواع البكتريا لا تستطيع تحليله	تستطيع كثير من البكتريا المنتجة لانزيم الجيلاتينيز من تحليله

تعقيم الاوساط الغذائية:-

لتحضير اي وسط غذائي يجب اتباع ما يلي:-

- ١- وزن كميات المواد لمستخدم بدقة.
- ٢- المحافظة على الوسط الغذائي معقم لاطول فترة ممكنة لان التعقيم هو ازالة كل الاحياء المجهرية الموجودة في الوسط الغذائي.

تعقم الاوساط الغذائية التي لا تحتوي على مواد تتلف بالحرارة باستعمال جهاز الاوتوكليف .

عملية التعقيم بهذا الجهاز تكون اعتياديا تحت ضغط ١٥ باوند/انج^٢ (ضغط جوي) ودرجة حرارة ١٢١م^٢ ولمدة ١٥-٢٠ دقيقة تحسب عندما يصل الضغط الى ١٥ وتختلف المدة الزمنية والضغط المستخدم بحسب البيئة المراد تعقيمها .

اما الاوساط الغذائية التي تحتوي على مواد تتلف بالحرارة كالفيتامينات والاحماض الامينية والسكريات عدا الكلوكوز فيجب ان تعقم بطرق اخرى غير الاوتوكليف وان طريقة الترشيح هي المفضلة حيث تستخدم بعض المرشحات مثل مرشح Millipore ذو الفتحات الدقيقة ٤٥ ميكرون او اقل والتي لا تسمح بمرور البكتريا من خلالها لكن الفايروسات تمر منها وبذلك تصبح البيئة معقمة بعد الترشيح (اما الفايروسات فهي لا تنمو على وسط غذائي صناعي بل تحتاج الى انسجة حية لنموها).

تحضير المرق المغذي والاكار المغذي :- Nutrient broth and Nutrient agar

المواد المطلوبة:-

٣غم	Beef extract مستخلص لحم
٥غم	Pepton ببتون
١٨غم	Agar-Agar اكار-اكار
١٠٠٠مل	Dist. H2O ماء مقطر
حجم ١٠مل	Pipettes ماصة
٢٥٠مل	Beakers بيكر عدد ٢
٥٠٠مل	Beakers بيكر عدد ٢
٢٥٠مل	Flasks فلاسكات ٢ حجم

مصباح بنزن

ميزان

Glass Stirring rod قضيب زجاجي

طريقة العمل:-

١ - تحضير المرق المغذي Nutrient broth:-

لتحضير ٢٥٠ مل من الوسط الغذائي المرق المغذي يتم اتباع ما يلي :-

- ١- امزج ٠,٧٥٠ غم من مستخلص اللحم و ١,٢٥٠ غم من البيبتون مع ٢٥٠ مل من الماء المقطر في بيكر حجمه ٥٠٠ مل ثم تمزج جيدا لحين ذوبان المواد .
- ٢- اضبط درجة حموضة الوسط (pH) باستعمال جهاز ال pH-meter باضافة حامض الهيدروكلوريك المخفف اذا ما اريد خفض ال pH او الصودا الكاوية المخففة اذا ما اريد رفع ال pH الى القيمة الملائمة لنمو البكتريا.
- ٣- حضر ٥ انابيب اختبار من الوسط الغذائي السابق كل منهما يحتوي لى ٨ مل والباقي يتم وضعه في فلاسك حجم ٢٥٠ مل.
- ٤- سد الانابيب والفلاسك بالقطن .
- ٥- عقم بجهاز الاوتوكليف تحت ضغط ١٥ باوند /انج^٢ وعلى درجة حرارة ١٢١ م^٢ لمدة ٢٠ دقيقة .

٢ - تحضير الاكار المغذي Nutrient agar:-

- ١- امزج ٠,٧٥٠ غم من مستخلص اللحم و ١,٢٥٠ غم من البيبتون و ٤,٥ غم من الاكار مع ٢٥٠ مل من الماء المقطر في بيكر حجمه ٥٠٠ مل.
- ٢- اغلي المخلوط السابق على مصباح بنزن مع الرج المستمر لكي لا تلتصق البيئة باسفل البيكر والى ان يذوب الاكار.
- ٣- اضبط pH الوسط الغذائي بنفس الطريقة السابقة.
- ٤- حضر ٣ انابيب اختبار كل منها يحتوي على ٦ مل واعملها بطريقة الاكار المائل Slant و ٣ انابيب بطريقة الاكار -اكار كل منها يحتوي على ٦ مل ايضا و ٣ بطريقة ال (Agar pour) كل منها يحتوي على ١٣ مل والباقي ضعه في فلاسك حجمه ٢٥٠ مل .
- ٥- غط الانابيب والفلاسك بالقطن.
- ٦- عقم بنفس الطريقة السابقة.