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 المكروسكوب 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 تركب على الذراع.
٧- المنظم الكبير(التقليدي)وهو يوجد على الذراع.
٨- المنظم الصغير (الدقيق).

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

ثانيا:- المجموعة البصرية Optical parts وتتكزن من :-

١- العدسة العينية ووضيفتها تكبير صورة الجسم المرئي الحقيقية الناتجة من العدسة الشيئيةوتكون 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 البؤري ٦١ ملم والعدسة الكبرا االجافة قوة تكبيرها ٤٠ مرة وبعدها البؤري من ٣,٢-٤ ملم والعدسة الكبيرة الزيتية تكون قوة تكبيرها ١٠٠ مرة وبعدها البؤري ١,٨ ملموالتي 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- ننتقل 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 اليكروسكوب :-

١- يجب التاكد 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 بالزايلول لان ترك العدسة دون تنظيف يؤدي الى التصاق الزيت عليها مما يؤدي الى تجمع الاتربة عليها وتخديشها اما عند تنظيفها فلا يحصل تخديش 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 تخديش 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
العدسة العينية
الضابط الكبير
الإسطوانة
الضابط الصغير
قرص تحريك العدسات الشيئية
الذراع
العدسة الشيئية
المسرح
مثبت ومحرك الشريحة
القاعدة
المصدر الضوئي
Photo: Jamil.F.Jaber

الدرس العملي الثاني :-

تصبيغ البكتريا :- Staining of bacteria

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

١- التصبيغ البسيط:- Simple staining

يتم هذا النوع من التصبيغ باستخدام صبغة واحدة فقط.

الغرض من التجربة:- التدريب على كيفية استخدام الميكروسكوب في فحص السلايدات المصبوغة بهذه الطريقة وقبل اجراء عملية التصبيغ سواء كان تصبيغ بسيط او باي طريقة اخرى فيجب تحضير ما يسمى بالغشاء البكتيري ويكون من المهم جدا معرفة تحضير هذا الغشاء وتثبيته 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 ترج 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 وتنشر 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 للتصبيغ. لحد هذه النقطة تسمى العملية بتحضير الغشاء البكتيري.

التصبيغ البسيط:-

تتم باستخدام صبغة واحدة وعادة ما تستخدم صبغة ازرق المثيلين (مثيلين بلو) او باستخدام صبغة السفرانين. وان طريقة التصبيغ هي:-

١- يغمر الغشاء بهذه االصبغة ويترك لمدة ٤٥ ثانية.

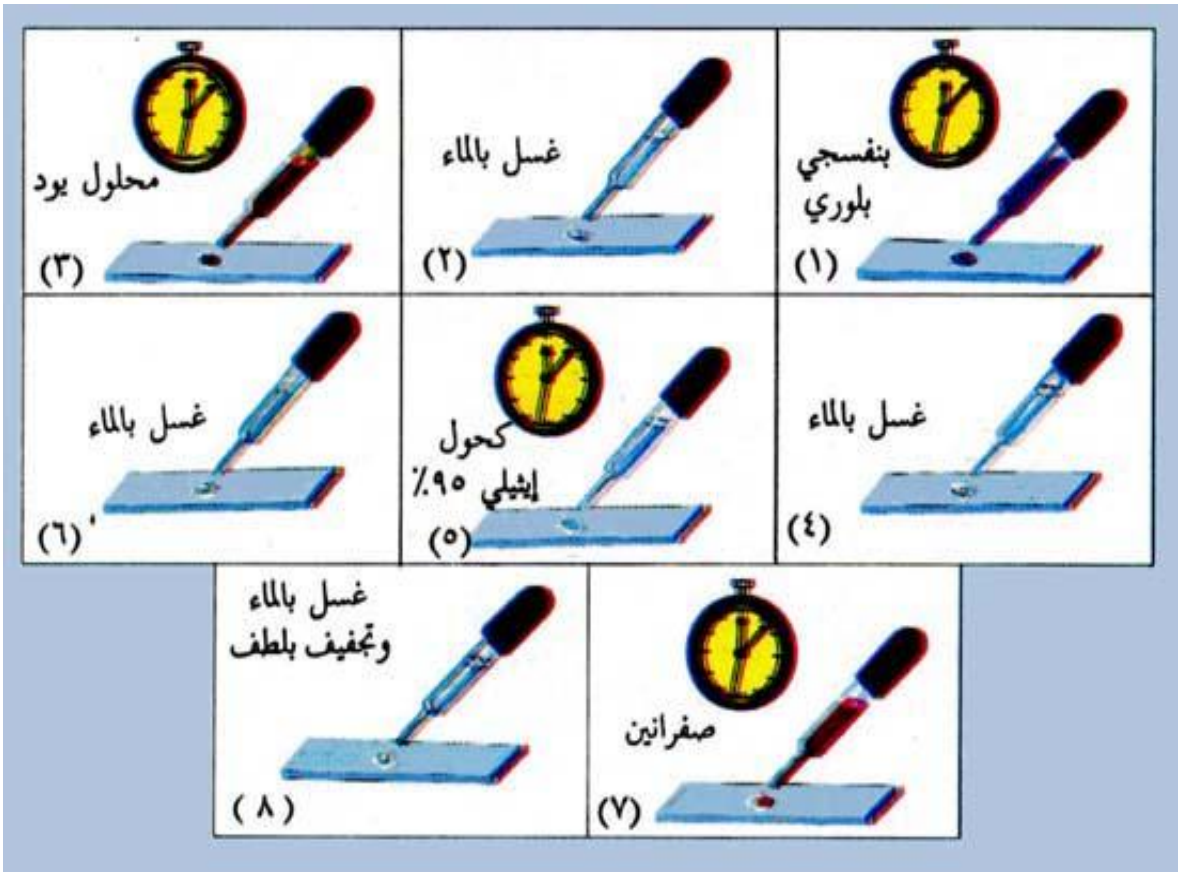
٢- يتم التخلص من الزائد من الصبغة في حوض الصبغ او على المغسل وذلك باستخدام تيار هادئ من ماء الحنفية ثم بعد ذلك يجفف السلايد بواسطة ورق نشاف.
٣- يكون السلايد جاهز للفحص بواسطة الميكروسكوب حيث يتم الفحص اولا بالعدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير ١٠ مرات . وباستخدام المنظم التقليدي يتم تحريك السلايد الى 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.

التصبيغ 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 ازالتها .



التفسير العلمي:- 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 ثقوب 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 فانها تحتفظ بالمعقد الجنسيان – اليود لذلك تحتفظ بلونها البنفسجي.

طريقة العمل:-

١- يحضر الغشاءيحضر 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 بنفسجي 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 ننتقل بالفحص بالعدسة الزيتية الكبرى مع استخدام قطرة الزيت وباستخدام المنظم الدقيق الى ان نشاهد البكتريا بوضوح وبذلك نرسم شكل البكتريا .

الدرس العملي الثالث:-

التصبيغ بطريقة Acid fast bacteria

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

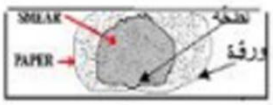
١- بكتريا صامدة للاحماض:- والتي سوف تنصبغ بصبغة الكاربون الحمراء Carbon fuchsin حيث تحتفظ هذه البكتريا بالصبغة ويكون من الصعب ازالتها من الخلية البكتيرية فتظهر تحت المجهر باللون الاحمر.
٢- بكتريا غير صامدة للاحماض:- تنصبغ البكتريا بهذه الصبغة ايضا لكنها تفقدها عند استخدام الكحول وتعود فتنصبغ بصبغة ازرق 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 ازالتها 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 تصبيغ البكتريا المسببة لمرض السل *Mycobacterium tuberculosis* والتي هي من نوع Acid fast bacteria

<u>طريقة العمل :-</u>

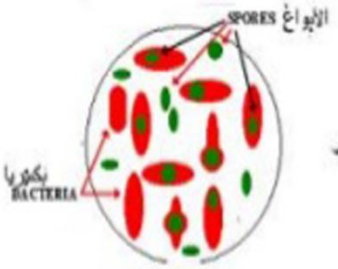
١- يحضر غشاء من البكتريا المراد فحصها ويثبت على اللهب .
٢- يوضع على حمام مائي في بيكر يحتوي على ماء حار ثم يغمر الغشاء بصبغة Carbon fuchsin ونستمر بالتسخين لمدة ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك باضافة الصبغة باستمرار لان جفاف الغشاء قد يؤدي الى ازالته .
٣- يبرد الغشاء ثم يغسل بتيار هادئ من ماء 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 ننتقل بالفحص باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة مع وضع قطرة من زيت السيدر.



تمرر الشريحة لمدة دقيقة واحدة

التخلص من ورقة الترشيح
والغسيل بماء الحنفية

غسيل الشريحة مع تجفيفها بورق منديل ← الكشف بالمجهر



الدرس العملي الرابع:-

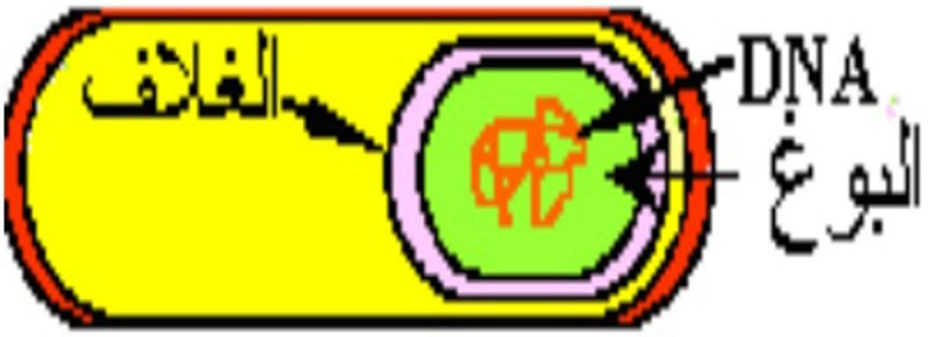
تصبيغ السبورات:- Spores staining

بعض انواع البكتريا وخاصة البكتريا التابعة لجنس Bacillus ولجنس 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 انبعض 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 يساعد اذ يعمل على نفاذ الصبغة الى داخل الخلية السبورية . واذا ما صبغت االسبورات 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 DNAمحاط بغلاف البوغ. ويظهر البوغ داخل الخلية الخضرية وسوف تفقد الخلية جزء الخضري منها مع مرور الوقت

الدرس العملي الخامس:-

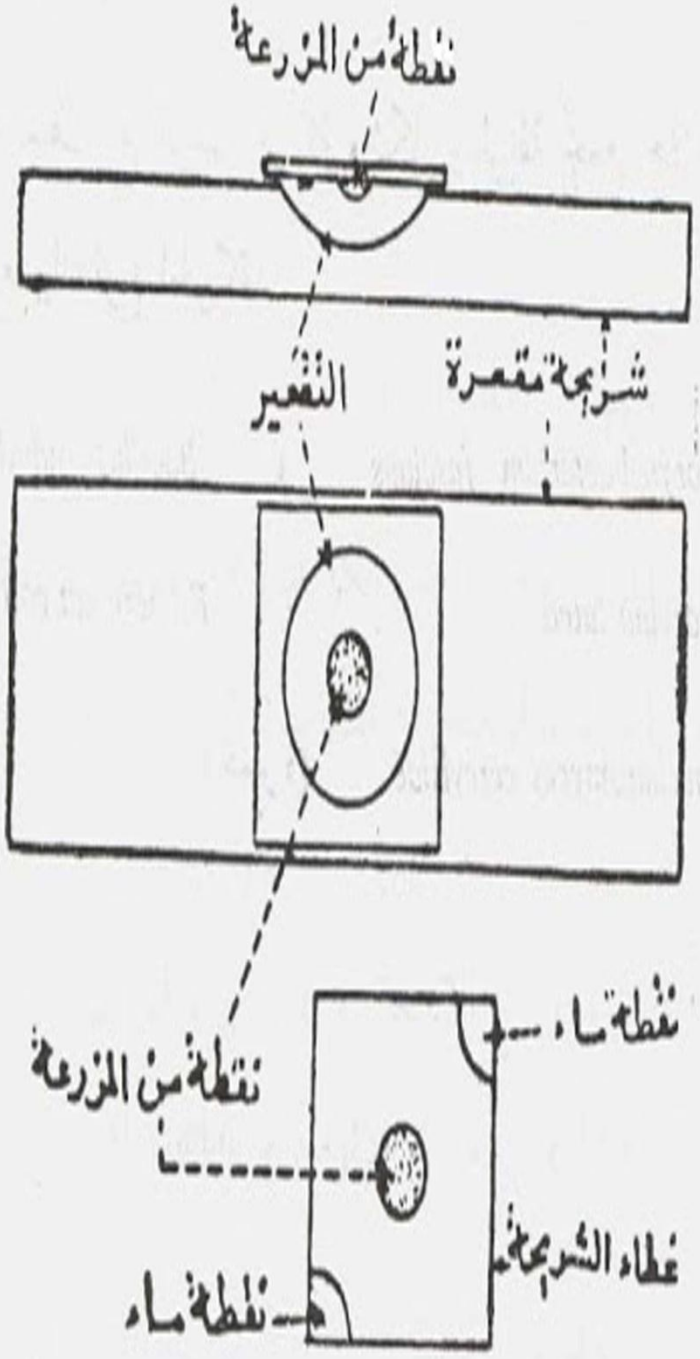
فحص حركة البكتريا بواسطة القطرة المعلقة:-

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 ننتقل 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 الميكروسكوبي 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،٠١مل من الحليب والتي تفرش على مساحة معلومة من السلايد او الشريحة والتي هي ١سم^{٢} بالضبط ومن ثم يفحص السلايد تحت المجهر ويتم عد الخلايا البكتيرية الموجودة في المجال الميكروسكوبي 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 الميكروسكوبي 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 ١سم^{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 ١سم^{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 ناخذ ٠،٠١مل من الحليب ونشرها على ١سم^{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 ليجف في هواء المختبر ثم توضع على حمام مائي لمدة ٥ دقائق وذلك كتثبيت الغشاء .
٤- يرفع السلايد من الحمام المائي ويضاف اليه قطرات من الزايلول Xylol 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- \يترك السلايد ليجف 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 ١مل من الحليب .

كيفية حساب مساحة المجال الميكروسكوبى:-

يتم استخدام شريحة ميكرومترية 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)= ٨٠×٨٠×٣,١٤ = ٢٠٠٠٠مساحة المجال الواحد

هناك عدة مجالات في ال سم^{٢} الواحد

عدد المجالات = مساحة المربع / مساحة المجال الواحد = ١ سم^{٢} / ٢٠٠٠٠ = ١٠٠٠٠×١٠٠٠٠ / ٢٠٠٠٠ = ٥٠٠٠

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 البكتريا في هذه المجالات ولتكن ١٥٠٠ خلية بكتيرية ثم ناخذ متوسط هذه الاعداد وذلك بقسمة عدد البكتريا على عدد المجالات التي تم قراءة اعداد البكتريا فيها وهي ١٥٠٠÷١٥=١٠٠خلية بكتيرية

نضرب متوسط عدد البكتريا × عدد المجالات الكلية ينتج عدد البكتريا 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 = ٥٠٠٠٠٠٠٠عدد الخلايا في ١مل حليب

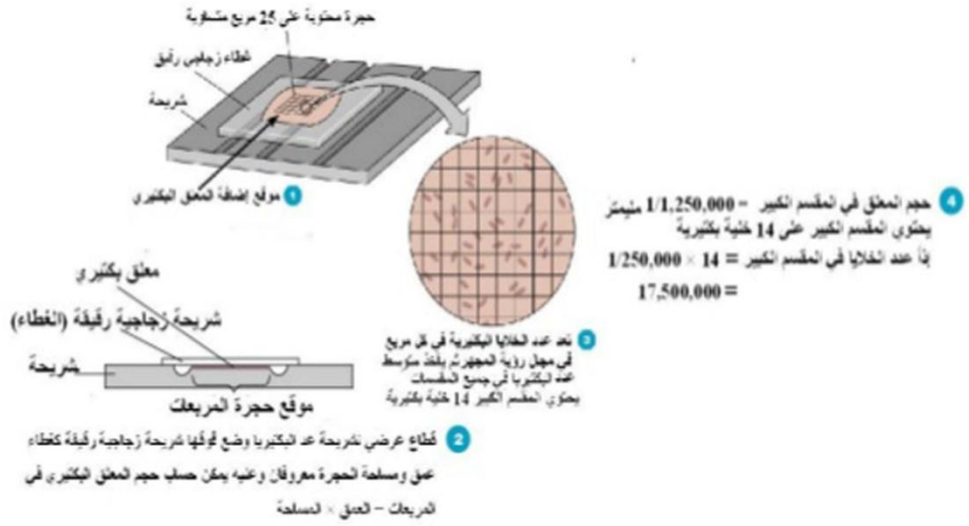
عيوب الطريقة:-

تعطي اعداد من البكتريا 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 انابيب اختبار تحتوي على ٩ مل من الماء المقطرالمعقم 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 (١مل)من التخفيف . بعد ذلك تضرب عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف لكي نحصل على عدد البكتريا في (١مل) 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 × ١٠ ليمثل اعداد البكتريا الموجودة في ١مل من العينة المخففة ومن ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف ليمثل اعداد البكتريا في ١مت من العينة الاصلية.

طريقة العمل :-

١- يحضر الوسط الغذائي N.A ويعقم في الاوتوكليف ويوضع في حمام مائي على درجة ٥٠مْ 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 ١٠/١ وبعد ان يتم رج الانبوبة هذه بشكل جيد يؤخذ منها ١مل ويضاف الى انبوبة اختبار اخرى حاوية على ٩مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف ١٠٠/١ونستمر باجراء التخافيف الى ان نصل الى التخفيف ١٠٠٠٠٠/١
٣- يؤخذ ١مل من اخر تخفيفين وتنقل الى اطباق بتري معقمة ويصب عليها الوسط الغذائي الموجود في الحمام المائي على ٥٠ مْ ويحرك الطبق بشكل الرقم ثمانية ليتم مزج العينة

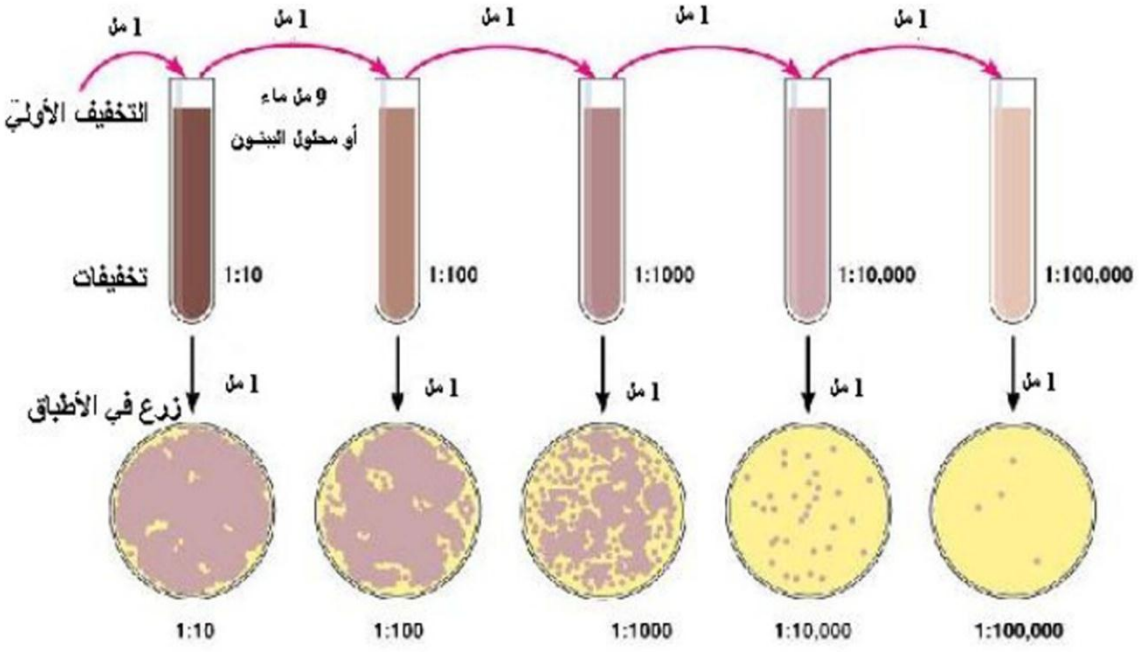
مع الوسط الغذائي ثم تترك الاطباق ليتصلب الوسط الغذائي وتنقل الى الحاضنة وتوضع بشكل مقلوب على ٣٥ مْ لمدة ٢٤- ٤٨ساعة .

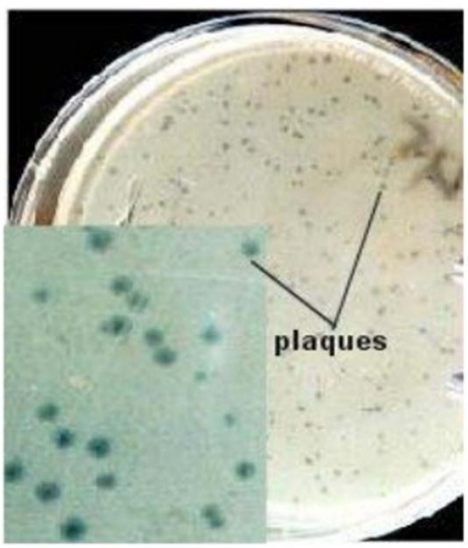
٤- تعد المستعمرات النامية والتي تكون بين ٣٠-٣٠٠ مستعمرة ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف فنحصل على اعداد البكتريا الموجودة في ١ مل من الحليب .

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 عل بيئة ملائمة 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 .

و هناك عدة انواع من طرق التعقيم منها:-

١- **التعقيم باستخدام افران الهواء الساخن**:- حيث ترتفع درجة حرارة الهواء كهربائيا او غازيا الى ١٦٠-١٨٠مْ 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 وانابيب 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- **اللهب 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 باللهب 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 (١٠٠مْ) 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 التاليوتعقم بهذه الطريقة المواد التي تتلف او تتغير خواسها الطبيعية والكيميائية عند تسخينها الى درجة حرارة اعلى من ١٠٠مْ مثل بيئات 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 ١٠٠مْ 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 السدادةتسمح بمرور البخار الى الداخل مثل القطن الطبي.

٥- **التعقيم بالبخار تحت الضغط (الاوتوكليف):**- يستغل بخار الماء في الاتوكليف 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 ١٢١مْ لمدة ربع ساعة الامر الذي لايكفي 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 ١٠٠مْ ويستخدم الاوتوكليف ايضا في اتلاف المزارع البكتيرية المرضية او المزارع غير المرغوبة و المراد القضاء عليها.

تعتمد هذه الظريقة 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 ١٠٠مْ ويرتفع الضغط طرديا مع زيادة كمية البخار حيث يقابل ذلك ارتفاع درجة غليان الماء .

يبين الجدول التالي علاقة الضغط بدرجة الحرارة والفترة اللازمة للتعقيم

الضغط الجوي	درجة الحرارة	المدة اللازمة للتعقيم
٠,٥ جوي	١١٣مْ	٣٠ دقيقة
١ جوي	١٢١مْ	١٥-٢٠ دقيقة
١،٥ جوي	١٢٨مْ	٥ دقائق
٢ جوي	١٣٤مْ	ثواني فقط

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الاوتوكليف:-

أ- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار المطلوب .
ب- التأكد من ان البخار يملأ الجهاز تماماوحل محل الهواء في الجهاز.
ت- يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد الوصول الى الضغط المطلوب
ث- 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 الاسيتيل سليلوز او مصنوع من الخزف غير المصقول او يكون مصنوع من الياف زجاجية متشابكة.

الاحتياطات التي تراعى عند التعقيم:-

أ- يجب تعقيم جهاز الترشيح بجميع ملحقاته بعد لفه بورق سميك مانع للرطوبة.
ب- يستخدم الضغط المخلخل(التفريغ) عند التعقيم بهذه الطريقة للاسراع من عملية الترشيح.
ت- 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.
ث- 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 االداخل 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 .

اولا: مواد كيمائية سطحية التاثير

تستخدم فى التطهير السطحى وقد يكون التطهير :

- **خارجى** (يشمل الجلد والاغشية المخاطية) تسمى بالمطهرات الخارجية Antiseptic وهى تؤدى الى قتل البكتريا ولاتؤثر على الجلد والاغشية المخاطية

- **سطحى :** تطهير المعامل والارضيات وادوات الجراحة تسمى المطهرت السطحية Disinfectantsوهى تؤدى الى قتل البكتريا وتؤثر على الجلد والاغشية المخاطية

امثلة لبعض المواد الكيمائية المشتخدمة 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 فيتلفها 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 صوديومى او بوتاسيومى للاحماض الدهنية ياتى تاثيره كمطهر من الازالة الميكانيكية للبكتريا، يقلل من التوتر السطحى للماء، يذيب الدهون والشحوم باستحلابها.

- **المنظفات**

مواد ذات تركيب اكثر كفاءة فى التطهير والتنظيف من الصابون، تقتل البكتريا منها :

- منظفات تتاين وتظل الانيونات ذات تاثير فى التنظيف وتعرف بـ (الصابون الايونى) مثل سلفات لوريل الصوديوم.
- منظفات تتاين وتظل الكاتيونات ذات تاثير فى التنظيف وتعرف بـ (الصابون الكاتيونى) مثل ستيل بريد ثيم وهو اقوى من الاول.
- منظفات لاتتاين ولاتبيد البكتريا.

مواد كيمائية مستعملة لعلاج الامراض البكترية

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

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

الدرس العملي التاسع:-

الفحص الميكروبي للمياه:-

بالاضافة 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 تبذيره 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 لايقل عن ٢٥ مرة ثم تجرى التخفيفات اللازمة (يعتمد ذلك على مدى تلوث الماء تحت الدراسة) ١٠/١ و ١٠٠/١ و ١٠٠٠/١ او اكثر ثم تخض التخافيف 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 التخافيف المعينة في انابيب تخمر fermentation tubes تحوي سائل اللاكتوز . تحضن الانابيب على درجة حرارة ٣٥مْ 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 greenlactose bile broth ، ENDO agar ، Eosin methylene blue(E M B) حيث تجرى عملية التلقيح التاكيدي 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 ٣٥مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم تفحص الاطباق عن وجود مستعمرات القولون المثالية Typical وبذلك يعتبر الفحص التاكيدي ايجابي 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 التاكيدي وتنقل المستعمرات على انفراد وتزرع في انابيب تخمر تحتوي على سكر اللاكتوز وعلى انابيب اختبار تحوي على الوسط الغذائي Nutrient agar بشكل مائل وبطريقة التخطيط Streak.

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

فاذا تكون الغاز في انابيب التخمر وكان التصبيغ سلبي 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 اللتموس :-

تلقح انبوبة تحوي على حليب اللتموس بمقدار ٠،١ مل من الماء قيد الدراسة ثم يحضن على درجة حرارة ٣٠-٣٢مْ لمدة ٢-٥ يوم ولاحظ تغير لون حليب اللتموس . اعمل شريحة من حليب اللتموس 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 الغذائي Plate count agar.

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

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

الدرس العملي العاشر:-

الاوساط 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 – Agarلتحويل 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 التلركيب الكيميائي وتسمىSynthetic media Non-.

ومن الامثلة عليها:-

Non -Synthetic media (معقدة)	Synthetic media (مركبة)
٣غم Beef extraxt	١ غم NaNo3
٥ غم Pepton	٠,٥ غم MgSo4
١٠٠٠مل ماء مقطر	٠,٠٣غم FeSo4
	١غم NaCo3
	١غم K2HPo4
	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 كمدصر للكربون والطاقة وتسمى غير ذاتية التغذية وهي لا تستطيع ان تستفاد 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 التغذيةحيث وجود مستخلص اللحم يكون مصدر للكربون والطاقة اضافة الة مادة اللبيتونالتي تستعمل كمصدر للنتروجين.

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 ٢٨مْ 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 ٩٦مْ اي ان الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة يبقى صلب ولا يتحول الى سائل الا عند درجة حرارة اكثر من ٩٦مْ وينجمد الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة تحت درجة حرارة ٤٢مْ 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	٩٦مْ	٢٨-٣٠مْ
درجة تجمده	٤٢مْ	تحت ٢٨مْ
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 لمستخدمة 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 لاتحتوي على مواد تتلف بالحرارة باستعمال جهاز الاوتوكليف .

عملية التعقيم بهذا الجهاز تكون اعتياديا تحت ضغط ١٥ باوند/انج^{٢} (ضغط جوي) ودرجة حرارة ١٢١مْ 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 ٤٥ميكرون او اقل والتي لاتسمح بمرور البكتريا من خلالها لكن الفايروسات تمر منها وبذلك تصبح البيئة معقمة بعد الترشيح (اما الفيروسات 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:-

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

مصباح بنزن

ميزان

قضيب زجاجي Glass Stirring rod

طريقة العمل:-

١ - تحضير المرق المغذي Nutrient broth:-

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

١- امزج ٠,٧٥٠غم من مستخلص اللحم و ١,٢٥٠ غم من الببتون مع ٢٥٠ مل من الماء المقطر في بيكر حجمه ٥٠٠مل 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 الpH الى القيمة الملائمة لنمو البكتريا.
٣- حضر ٥ انابيب ختبار من الوسط الغذائي السابق كل منهما يحتوي لى ٨مل 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 ١٢١مْ لمدة ٢٠ دقيقة .

٢ - تحضيرالاكار المغذي Nutrient agar:-

١- امزج ٠,٧٥٠غم من مستخلص اللحم و ١,٢٥٠غم من الببتون و٤,٥غم من الاكار مع ٢٥٠مل 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 ٦مل واعملها بطريقة الاكار المائل Slant و٣ انابيب بطريقة الاكار –اكار كل منها يحتوي على ٦ مل ايضا و٣ بطريقة ال (Agar pour) كل منها يحتوي على ١٣مل والباقي ضعه في فلاسك حجمه ٢٥٠مل .
٥- غط الانابيب والفلاسك بالقطن.
٦- عقم بنفس الطريقة السابقة.