الدرس العملي الأول

المجهر – Microscope

يعتبر المجهر من أهم الأدوات المستخدمة في علم الأحياء حيث يستخدم في دراسة الأجسام الصغيرة التي لانستطيع أن نراها بواسطة العين المجردة، فهو يمكننا من رؤية التفاصيل الدقيقة للعينة المراد الكشف عنها، وكلمة "مجهرية" أو "مجهري" تستخدم لوصف الشيء الذي لا يمكن رؤيته إلا بمساعدة المجهر، والمجهر أحد الأجهزة الأوسع استخداما في علم الأحياء، ويستخدمه علماء الأحياء لدراسة الكائنات الحية والخلايا وأجزائها الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة. هناك عدة أنواع من المجهر منها المجهر البسيط والمجهر المركب (المجهر الإلكتروني).

أجزاء المجهر الضوئي المركب:

يتكون المجهر من مجموعتين رئيسيتين هما:

أولاً: المجموعة الآلية – Mechanical Parts

والتي تتكون من الأجزاء التالية:

1- **قاعدة المجهر:** هو الجزء الذي يستند عليه جميع أجزاء المجهر.
2- **الحامل:** الجزء الذي يتركب على القاعدة ويمكن إمالته نحو الفاحص.
3- **الذراع:** الجزء الذي يحمل بواسطته المجهر وهي توجد في أسفل الحامل.
4- **المسرح:** عبارة عن صفيحة معدنية مربعة الشكل توضع الشريحة المراد فحصها عليه ويوجد في مركزها فتحة صغيرة تسمح بمرور الضوء خلال الشريحة وتوجد في أعلى الحامل.
5- **الأنبوبة أو الأنبوب:** تحمل في أعلاها العدسة العينية أو العدستان العينيتان وتحمل في أسفلها العدسة الشيئية التي تكون مركبة عليها.
6- **القطعة الأتقية (القرص الدوار):** هي القطعة التي يمكن تحريكها حركة دائرية للانتقال من عدسة إلى أخرى وهي تركب على الذراع.
7- **المنظم الكبير (التقليدي):** يوجد على ذراع المجهر وهو عبارة عن عتلة كبيرة موجودة على جانبي المجهر، تستعمل لتنظيم المسافة بين المنضدة والعدسة الشيئية للحصول على رؤية واضحة، حيث يتم استعمالها في حال العدسة ذات قوة التكبير الصغرى x4 أو قوة التكبير

الوسطى x10 ولا تستخدم في حال استخدام العدسة الشيئية الكبرى x40 أو العدسة الزيتية x100.

8- **المنظم الصغير (الدقيق):** عبارة عن عتلة صغيرة موجودة أيضاً على جانبي المجهر حيث تستخدم للمساعدة على رؤية العينة بصورة أوضح، ويتم استخدام الضابط الصغير في حال استخدام العدسة الشيئية الكبرى x40 أو العدسة الزيتية x100.

9- **الملاقط:** وهناك ملقطان على المنضدة يستعملان لتثبيت الشرائح عليها.

10- **الفلاتر.**

* يستعمل المنظم الكبير في رفع أنبوبة المجهر وخفضها وبحركة سريعة نسبياً، أما المنظم الصغير فيحرك الأنبوبة حركة بطيئة نسبياً.

ثانياً: المجموعة البصرية – Optical Parts: ويتكون من

1- **العدسة العينية:** هي عدسة محدبة الوجهين مثبتة في الطرف العلوي للأنبوبة وظيفتها تكبير صورة الجسم المرئي الحقيقية الناتجة من العدسة الشيئية وتكون قوة تكبيرها 10 مرات.

2- **العدسة الشيئية:** وهي عادة تكون 2-4 عدسات وظيفتها تكوين صورة حقيقية معكوسة ومكبرة داخل جزء الأنبوبة العلوي وتكون قوة تكبير العدسة الصغيرة 10 مرات وبعدها البؤري 61 ملم والعدسة الكبرى الجافة قوة تكبيرها 40 مرة وبعده البؤري 3.2 – 4 ملم والعدسة الكبرى الزيتية تكون قوة تكبيرها 100 مرة وبعدها البؤري 1.8 ملم وعادة يجب عند استعمالها وضع قطرة من الزيت من نوع زيت السيدر التي تغمر بها العدسة وتسمى العدسة الزيتية المنغمسة، وقد سميت بالعدسة الشيئية لأنها تكون قريبة من الشي المراد تكبيرهُ.

❁ **فائدة زيت السيدر:** يمنع تشتت الضوء القادم من المصباح إلى العدسة، ويراعى أنه كلما زادت قوة تكبير العدسة المنغمسة كلما قلت المسافة بينها وبين الجسم المرئي.

3- **المكثف:** يوجد تحت المسرح وظيفته تجميع الحزمة الضوئية القادمة من المصباح إلى داخل العدسة ويمكن تعديل كمية الضوء التي تسقط إلى العدسة بتحريك المكثف إلى الأعلى أو الأسفل.

4- **الحجاب:** ويكون مركب في أسفل المكثف ويمكن قفلهُ أو فتحهُ للتحكم بكمية الضوء الذي يصل إلى العدسة.

5- **المرآة أو المضيء:** وظيفة المرآة عكس وتوجيه الأشعة من مصدر خارجي إلى العدسة الشيئية مارة بالشريحة المراد تكبيرها، وللمرآة سطحان أحداهما مستو والآخر مقعر، وذلك للتحكم بكثافة الضوء المنعكس، وقد استعيض عن المرآة في المجهر الجديد بمصدر ضوئي ثابت يدعى المضيء كذلك يمكن التحكم بشدة الضوء من خلال التحكم بفولتية المحولة المرتبطة بالمصدر الضوئي.

طريقة الفحص بالمجهر المركب:

1- يتم تشغيل المصباح الكهربائي للحصول على أكبر كمية من الضوء في المجال الميكروسكوبي، وتتم هذه العملية كما يلي:

أ- رفع المكثف إلى أعلى ما يمكن.

ب- يفتح الحجاب على آخرهُ.

جـ- نستخدم العدسة الصغرى ذات قوة التكبير 10 مرات إلى أن نحصل على أكبر كمية من الإضاءة.

2- يوضع السلايد أو الشريحة الحاوية على الخلايا المراد فحصها على المسرح ثم يستخدم المنظم الكبير لتحريك الشريحة إلى الأعلى أو السفل إلى ان نرى آثار الصبغة.

3- ننتقل إلى العدسة الزيتية الكبرى التي قوة تكبيرها 100 مرة مع وضع قطرة من زيت السيدر على الشريحة ثم نغمس العدسة بالزيت ثم نقوم بتحريك المنظم الصغير (الدقيق) إلى أن نحصل على الصورة للخلايا الموجودة على السلايد.

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل المجهر:

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

2- يجب عدم لمس العدسات بأصابع اليد.

3- عدم تحريك العدسات من مكانها.

4- في حالة استخدام العدسة الزيتية المنغمسة وعند الانتهاء من استخدامها يجب إزالة الزيت المتبقي على العدسة باستخدام أوراق تنظيف العدسات المبللة بالزايلول لأن ترك العدسة دون تنظيف يؤدي إلى التصاق الزيت عليها مما يؤدي إلى تجمع الأتربة عليها وتخديشها، أما عند

تنظيفها فلا يحصل تخديش للعدسة ولا تتجمع عليها الأوساخ وفي حالة عدم توفر هذا النوع من الورق فمن الممكن استخدام ورق لف السكائر للتنظيف ولا يجوز أطلاقاً استخدام القطن والكلينكس في تنظيف العدسات لأن هذا سوف يؤدي إلى تخديش العدسات وتلفها وذلك لأنها سوف تترك الياف رفيعة على العدسة مما يؤدي إلى تلفها.

5- يحمل المجهر من الحامل بيد وتوضع اليد الأخرى أسفل المجهر عند نقلهُ من مكان إلى آخر مع ملاحظة تغطيتهُ بغطاء بلاستيكي قبل وضعهُ بالصندوق.

الدرس العملي الثاني

تصبيغ البكتريا – Staining of bacteria

الغرض من التصبيغ هو دراسة أشكال وتجمعات البكتريا بعد صبغها بإحدى الصبغات الخاصة وأنه هناك أكثر من طريقة لتصبيغ البكتريا، ومنها:

1- الصبغات البسيطة – Simple staining

- الصبغات القاعدية.
- الصبغات الحامضية.

2- الصبغات التفريقية (المركبة) – Differential (Compound) Stains

- صبغة كرام.

3- صبغات التراكيب – Structural Stain

- صبغة الأبواغ.
- صبغة المحفظة.
- صبغة الاسواط.

وسوف نتناول فكرة عن هذه الصبغات:

1- التصبيغ البسيط – Simple staining

يتم هذا النوع من التصبيغ باستخدام صبغة واحدة فقط في جميع مراحل التصبيغ ولها دور مهم في التعرف على شكل البكتريا وحجمها وترتيبها وبالتالي تساعد في التشخيص الأولي للبكتريا من الأمثلة عليها: صبغة ازرق المثيلين Methylene Blue والسفرانين Safranine.

وقبل إجراء عملية التصبيغ سواء كان تصبيغ بسيط أو بأي طريقة اخرى فيجب تحضير ما يسمى بالغشاء البكتيري ويكون من المهم جداً معرفة تحضير هذا الغشاء وتثبيته على الشريحة.

طريقة العمل لتحضير الغشاء البكتيري:

1- 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 إذا كانت الشريحة جديدة فأنها لا تحتاج إلى هذه الخطوات.

2- تعقيم إبرة التلقيح (اللوب) على لهب مصباح بنزن ثم تترك لتبرد قبل أن تؤخذ مسحة من المزرعة النقية المراد فحصها بعد أن ترج بشكل جيد إذا كانت المزرعة سائلة مع مراعات ظروف التعقيم، إما إذا كانت المزرعة المراد فحصها صلبة فتؤخذ قطرة من ماء الحنفية بواسطة إبرة التلقيح المعقمة وتوضع على الشريحة ثم تؤخذ جزء من المزرعة الصلبة وتمزج

مع قطرة الماء وتنشر على مساحة 1 سم^2 ثم تترك لتجف بهواء المختبر للحصول على غشاء رقيق.

3- بعد جفاف الغشاء تمرر الشريحة على لهب من 5-6 مرات والغرض من هذه العملية هي قتل الخلايا البكتيرية والعمل على التصاقها على الشريحة وهي ما يسمى بتثبيت الغشاء البكتيري.

4- بعد ذلك يكون الغشاء جاهز للتصبيغ لحد هذه النقطة تسمى العملية بتحضير الغشاء البكتيري.

طريقة العمل للتصبيغ البسيط:

تتم باستخدام صبغة واحدة عادة ما تستخدم صبغة أزرق المثيلين (مثيلين بلو) أو باستخدام صبغة السفرانين. وأن طريقة التصبيغ تتم كالآتي:

1- يغمر الغشاء بهذه الصبغة ويترك لمدة 45 ثانية.

2- يتم التخلص من الزائد من الصبغة في حوض الصبغ أو على المغسل وذلك باستخدام تيار هادئ من ماء الحنفية، ثم بعد ذلك يجفف السلايد بواسطة ورق النشاف.

3- يكون السلايد جاهز للفحص بواسطة المجهر حيث يتم الفحص أولاً بالعدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير 10 مرات، وباستخدام المنظم التقليدي (الكبير) يتم تحريك السلايد إلى الأعلى حتى يتم ملاحظة آثار العينة ثم بعد ذلك توضع قطرة من الزيت على السلايد ثم ننتقل للفحص بالعدسة الشيئية المنغمسة وباستخدام المنظم الصغير يتم تحريك السلايد إلى أن نحصل على أوضح صورة للخلايا الموجودة على السلايد.

2- التصبيغ بطريقة كرام:

تعتبر صبغة كرام من أهم أنواع الصبغات المركبة أو التفريقية وأول من أستعملها الطبيب الدنماركي كريستيان كرام عام 1884م والتي على أساسها تقسم البكتيريا إلى قسمين هما

أ- البكتريا الموجبة لصبغة كرام G^+ والتي تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي.

ب-البكتيريا السالبة لصبغة كرام G^- والتي تفقد صبغة الجنشيان البنفسجي وتعود وتتصبغ بصبغة السفرانين الحمراء وتظهر تحت المجهر باللون الأحمر.

وقبل إضافة الكحول يجب استعمال محلول اليود الذي يعمل على تثبيت الصبغة البنفسجي حيث يتحد اليود مع الصبغة مكون معقد الجنشيان –اليود الذي يترسب على جدار الخلية البكتيرية ويكون من

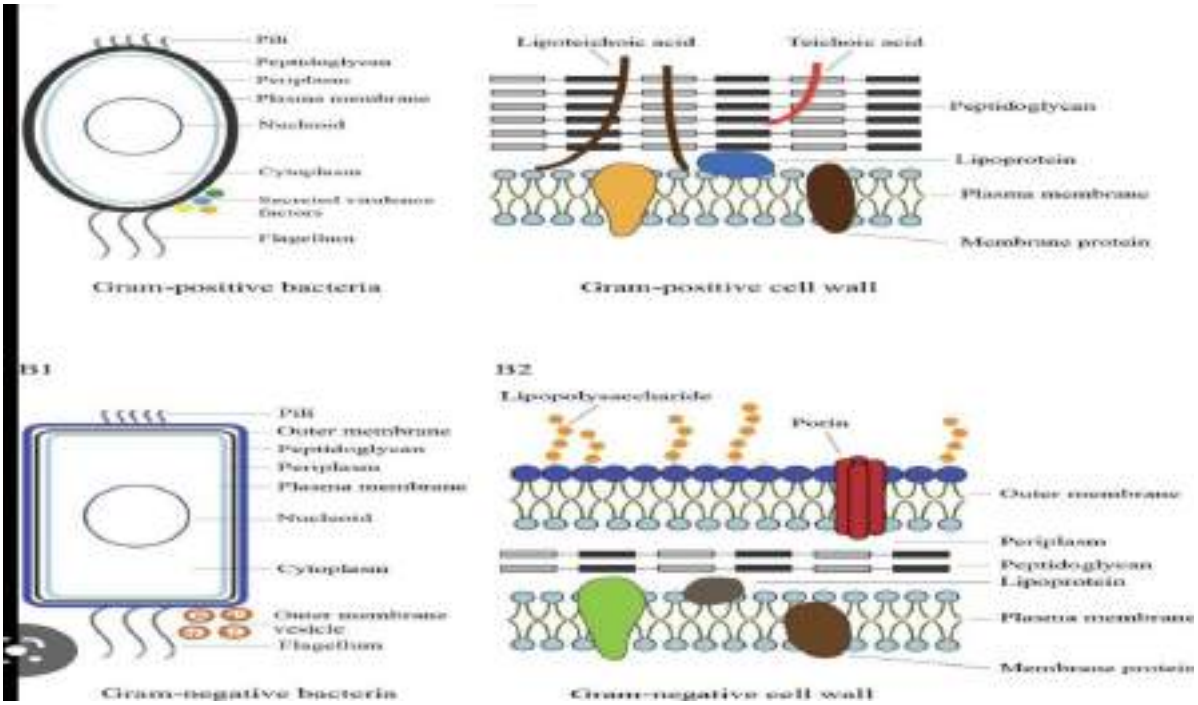
الصعب إزالته في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما في البكتيريا السالبة لصبغة كرام يسهل إزالتها.

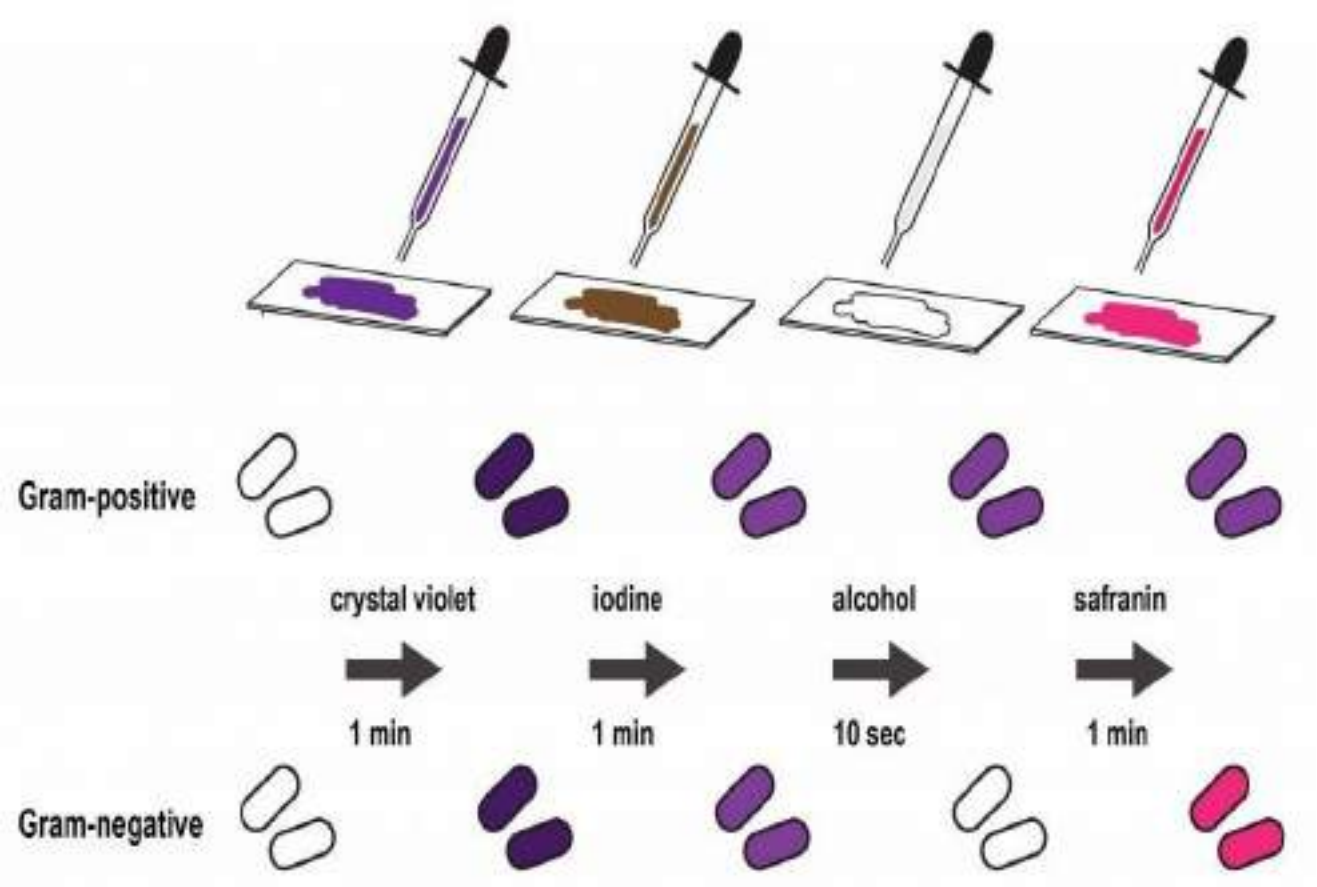
التفسير العلمي لطريقة كرام لصبغ البكتيريا:

أن الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام يكون حاوي على نسبة دهن أكبر مما في حالة البكتيريا الموجبة لصبغة كرام لذلك فأنه عند إضافة الكحول فأنهُ سيعمل على إزالة الدهن الموجود في الجدار الخلوي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام مما يؤدي إلى حدوث ثقوب في جدار الخلية البكتيرية أي أن معقد الجنشيان–اليود يمكن أن يزال عند إضافة الكحول فتصبح البكتيريا عديمة اللون وتكون جاهزة للأصطباغ بصبغة السفرانين الحمراء اللون. بينما البكتيريا الموجبة لصبغة كرام يكون جدارها حاوي على نسبة دهن قليلة ولذلك فأنها تحتفظ بالمعقد الجنشيان–اليود لذلك تحتفظ بلونها البنفسجي.

طريقة العمل لصبغة كرام:

1- يحضر الغشاء البكتيري للبكتيريا المراد اختبارها ويثبت على اللهب.
2- يغمر الغشاء بصبغة الجنشيان البنفسجي لمدة 45 ثانية ثم بعد ذلك نتخلص من الزائد من الصبغة بغسلها بتيار هادئ من ماء الحنفية.
3- نغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة 45 ثانية فيتحد مع صبغة الجنشيان البنفسجي مكون معقد ثم بعد ذلك تغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية.
4- يغمر الغشاء بالكحول لمدة 20 ثانية ةيفضل إضافة الكحول على شكل قطرات إلى أن يصبح لون الكحول الزال بنفسجي فاتح وعلى أن لا تزيد الفترة عن 20 ثانية ثم تغسل بماء الحنفية.
5- يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء ولمدة 30 ثانية ومن ثم يتم التخلص من الصبغة الزائدة بغسلها بتيار من ماء الحنفية الهادئ.
6- يجفف السلايد بورق النشاف.
7- يفحص السلايد بالمجهر باستخدام العدسة الشيئية الصغرى إلى أن نلاحظ آثار الصبغة ثم ننتقل بالفحص بالعدسة الشيئية الكبرى مع استخدام قطرة من الزيت ونستخدم المنظم الدقيق (الصغير) إلى أن نشاهد البكتيريا بوضوح وبذبلك نرسم شكل البكتيريا.


Pili
Peptidoglycan
Periplasm
Plasma membrane
Nucleoid
Cytoplasm
Flagellum
Gram-positive bacteria
Lipoteichoic acid
Teichoic acid
Peptidoglycan
Lipoprotein
Plasma membrane
Membrane protein
Gram-positive cell wall
B1
Pili
Outer membrane
Peptidoglycan
Periplasm
Plasma membrane
Nucleoid
Cytoplasm
Outer membrane vesicle
Flagellum
Gram-negative bacteria
B2
Lipopolysaccharide
Porin
Outer membrane
Periplasm
Peptidoglycan
Lipoprotein
Plasma membrane
Membrane protein
Gram-negative cell wall


Gram-positive
crystal violet
iodine
alcohol
safranin
1 min
1 min
10 sec
1 min
Gram-negative

الدرس العملي الثالث

التصبيغ بطريقة Acid Fast bacteria

تعتبر هذه الطريقة من طرق الصبغ المركب إلا أن الهدف من استعمالها يختلف قليلاً عن التصبيغ بصبغة كرام فقد تمكن كل من العالمين زيهل Ziehl ونيلسون Neelsen سنة (1883م) من التوصل إلى طريقة تم بها صبغ البكتيريا المسببة لمرض السل حيث يصعب صبغها بالطرق المعتادة وذلك بعد أبحاث طويلة حيث لم يتم رؤية المسبب قبل ذلك.

* **صامدة للصبغة:** هي خاصية فيزيائية لبعض أنواع البكتيريا، تشير إلى مقاومتها لإزالة الصبغة بالأحماض خلال عملية الصبغ.
* يتم تصنيف البكتريا على أساس هذه الطريقة من التصبيغ إلى قسمين هما:

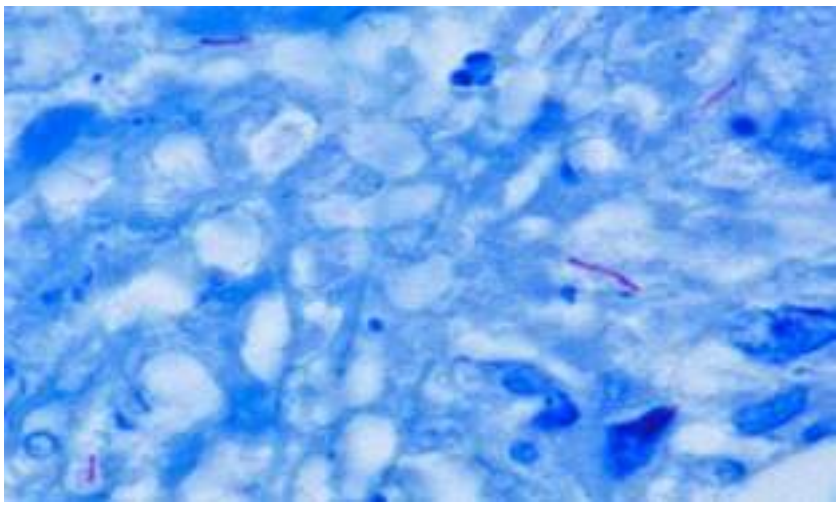
1- **بكتريا صامدة للأحماض:** والتي سوف تنصبغ بصبغة الكاربون الحمراء Carbon fuchsin حيث تحتفظ هذه البكتريا بالصبغة ويكون من الصعب إزالتها من الخلية البكتيرية فتظهر تحت المجهر باللون الأحمر.

2- **بكتيريا غير الصامدة للصبغة:** تتصبغ البكتيريا بصبغة الكاربون الحمراء Carbon fuchsin أيضاً لكنها تفقدها عند استخدام الكحول وتعود فتتصبغ بصبغة ازرق المثيلين الزرقاء اللون.

وتستخدم الحرارة كعامل مساعد على إدخال الصبغة إلى داخل الخلية البكتيرية التي تكون حاوية على نسبة عالية من حامض الميكوليك mycolic acid وهو مادة شمعية.

لهذه الطريقة بعض التطبيقات في مجال الطب حيث تستخدم في تصبيغ البكتيريا المسببة لمرض السل Mycobacterium tuberculosis وبكتيريا الجذام Leprosy.

والسبب في تحديد أن البكتريا صامدة للصبغة هو احتواء جذر الخلايا البكتيرية الصامدة للأحماض على دهون شمعية تسمى حامض الميكوليك Mycolic acid تجعل جذر الخلايا لا تنفذ معظم الأصباغ.



طريقة العمل:

1- يحضر غشاء البكتيريا المراد فحصها ويثبت على اللهب.

2- يوضع على حمام مائي في بيكر يحتوي على ماء حار ثم يغمر الغشاء بصبغة Carbon fuchsin ونستمر بالتسخين لمدة 5 دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك بإضافة الصبغة باستمرار لأن جفاف الغشاء قد يؤدي إلى إزالته.

3- يبرد الغشاء ثم يغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية للتخلص من الزائد من الصبغة.

4- يغسل الغشاء بإضافة الكحول المحمض الذي يضاف على شكل قطرات أو باستخدام ماصة أو يغمر الغشاء بالكحول لمدة 20-30 ثانية ثم يغسل بماء الحنفية للتخلص من الكحول الزائد.

5- يغمر الغشاء بصبغة ازرق المثيلين لمدة 45 ثانية ثم نتخلص من الزائد من الصبغة بغسله بتيار من ماء الحنفية.

6- يجفف السلايد بورق النشاف.

7- يفحص بالمجهر باستخدام العدسة الشيئية الصغرى أولاً ثم ننتقل بالفحص باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة مع وضع قطرة من زيت السيدر.

* **الكحول المحمض:** هو كحول تركيزهُ 95% ويضاف لهُ حامض الهيدروكلوريك HCl بنسبة 3% (97 مل كحول + 3 مل حامض الهيدروكلوريك HCl).

الدرس العملي الرابع

تصبيغ السبورات – Spores staining:

بعض أنواع البكتيريا وخاصة البكتريا التابعة لجنس Bacillus ولجنس Clostridium يكون لها القابلية على مقاومة الظروف غير الطبيعية عن طريق تغيير شكلها من الخلية الخضرية إلى ما يسمى بالسبور الداخلي Endo spore وقد وجد أن بعض السبورات ممكن أن تبقى حية في ماء مغلي لمدة 2–3 ساعات بالإضافة إلى مقاومة السبورات لبعض المواد الكيميائية والتي تستخدم في القضاء على الخلايا الخضرية ولا يمكن صبغ السبورات بالإضافة الاعتيادية إلا أذا استخدامنا الحرارة كعامل مساعد يساعد إذ يعمل على نفاذ الصبغة إلى داخل الخلية السبورية. وإذا ما صبغت السبورات فأنهُ يكون من الصعب إزالة الصبغة منها.

هناك عدة طرق لصبغ السبورات وأن من أكثر هذه الطرق شيوعاً هو استخدام صبغة اخضر الملاكايت Malachite Green لصبغ السبورات ويتم استعمال صبغة السفرانين Safranin لصبغ الخلايا الخضرية أو الجزء الخضري من الخلية في حالة كون الخلية لازالت في طور التحول من خلية خضرية إلى سبور وعند الفحص تحت المجهر سوف نشاهد خلايا خضرية كاملة تتصبغ باللون الأحمر وسبورات يكون لونها اخضر بالإضافة إلى وجود خلايا في طور التحول مصبوغة باللون الأحمر والاخضر.

طريقة العمل:

1- يحضر غشاء من المزرعة البكتيرية المراد فحصها وتثبت على اللهب مع ملاحظة أن المزرعة المفحوصة أو المستخدمة يجب أن لا يزيد عمرها عن 24–48 ساعة.
2- يوضع السلايد على حمام مائي في بيكر ثم يغمر الغشاء بصبغة اخضر الملاكايت ونستمر بالتسخين لمدة 5 دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك بإضافة الصبغة بشكل مستمر لأن عملية الجفاف تؤدي إلى تلف الغشاء.
3- يبرد السلايد ثم يغسل بتيار هادئ من الماء الحنفية.
4- يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء لمدة 45 ثانية ثم يزال الزائد من الصبغة ويغسل بتيار من ماء الحنفية ثم يجفف الغشاء بورق النشاف.

يفحص السلايد تحت المجهر باستخدام العدسة الشيئية الصغرى ثم العدسة الزيتية المنغمسة مع إضافة قطرة من الزيت ونلاحظ اشكال والوان الخلايا والسبورات التي سوف تظهر تحت المجهر.

الدرس العملي الخامس

فحص حركة البكتيريا بواسطة القطرة المعلقة

تكون البكتيريا أما متحركة وتسمى Mobile أو غير متحركة وتسمى Non mobile تتم حركة البكتيريا بواسطة الأسواط Flagella أما البكتيريا غير المتحركة فتظهر ساكنة عند فحصها بالمجهر وقد تظهر مهتزة دون أن تنتقل من مكانها وتكون هذه الحركة الاهتزازية ناتجة عن حركة الجزيئات الموجودة في البكتيريا وتسمى هذه الحركة بالحركة البراونية. وتظهر حركة البكتيريا في المزارع السائلة الحديثة والتي لا يزيد عمرها عن 24–48 ساعة.

فالبكتيريا لها نوعين من الحركات:

أ- حركة حقيقية true (vital) movement ترجع إلى وجود الأسواط flagella ويمكننا دراسة الحركة في البكتيريا بطريقتين:

1- الطريقة المباشرة: صبغ الأسواط staining the flagella of bacteria

2- الطريقة غير المباشرة: باستعمال طريقة القطرة المعلقة Hanging drop preparation

3- طريقة تلقيح البيئة الصلبة بالوخز بالميكروب المراد معرفة حركته في أنابيب الآجار العميق

ب- حركة براونية Brownian movement ترجع إلى تصادم البكتيريا بجزيئات وسط الانتشار.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- مزرعة *Bacillus* في بيئة المرق المغذي عمرها 24 ساعة.

2- شرائح ذات تجويف slide.

3- غطاء شرائح slide cover.

طريقة العمل

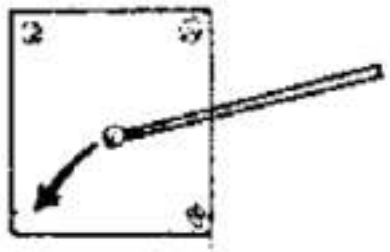
1- بواسطة إبرة التلقيح المعقمة يؤخذ 4 قطرات صغيرة من ماء الحنفية أو قطرات من الفازلين وتوضع في الأركان الأربعة لغطاء السلايد Cover slide الذي يكون موضوع على المنضدة.

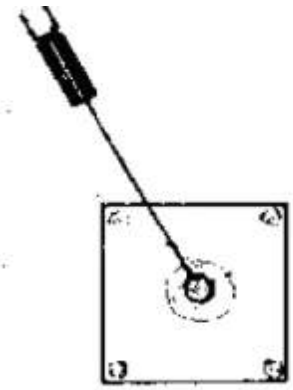
2- تؤخذ عقدة من المزرعة المراد فحصها وتوضع في وسط غطاء السلايد.

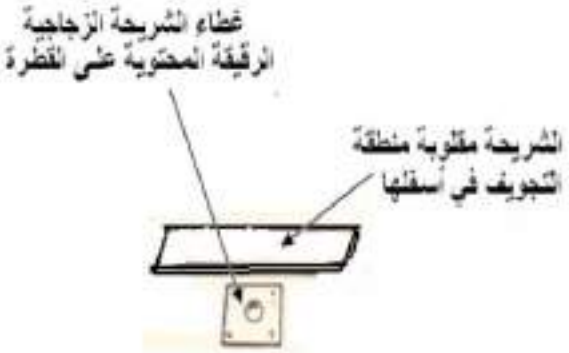
3- يؤخذ السلايد المقعر بحيث يكون التقعر إلى الأسفل ويوضع على غطاء السلايد باحتراس وانتباه شديدين بحيث تكون القطرة في وسط التقعر. فائدة قطرة الماء تعمل على التصاق غطاء السلايد بالسلايد.

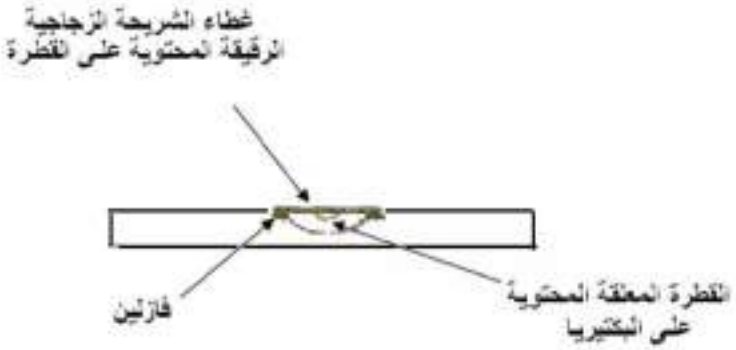
4- يقلب ببطئ وعناية بحيث تكون القطرة معلقة في وسط الغطاء.

5- يفحص السلايد بالمجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم بالفحص بالعدسة الجافة الكبرى ذات قوة التكبير 40 مرة مع تقليل الإضاءة لمشاهدة حركة البكتيريا إذا كانت متحركة أو ملاحظة سكونها إذا كانت ساكنة (غير متحركة).









الدرس العملي السادس

طرق عد البكتيريا

هنالك طرق عديدة يتم بواسطتها تقدير اعداد البكتيريا الموجودة في عينات الأغذية أو المياه أو الحليب والهدف من عد البكتيريا في هذه العينات هو التعرف على كثافتها العددية وبالتالي مقدار تلوثها ويمكن تقسيم طرق العد إلى:

أ- طريقة العد الميكروسكوبي المباشر.

ب-طريقة العد بطريقة الأطباق المصبوبة.

أ- طريقة العد الميكروسكوبي المباشر:

تستخدم هذه الطريقة في حساب أعداد البكتيريا في عينة من الحليب الخام لمعرفة جودة هذا الحليب ونوعيتهُ ومدى تلوثه بالأحياء المجهرية أو البكتيرية، وتتم هذه الطريقة بوضع كمية معروفة الحجم من الحليب والتي هي 0.01 مل من الحليب والتي تفرش على مساحة معلومة من السلايد او الشريحة والتي هي 1 سم^2 بالضبط ومن ثم يفحص السلايد تحت المجهر ويتم عد الخلايا البكتيرية الموجودة في المجال الميكروسكوبي الواحد والذي هو جزء من السلايد الذي يمكن رؤيتهُ في الميكروسكوب. وبطريقة حسابية بسيطة يمكن معرفة أعداد البكتيريا الموجودة في حجم معين من الحليب وذلك لحساب مساحة المجال الميكروسكوبي الواحد ثم حساب عدد المجالات الموجودة في1 سم^2 ثم يضرب عدد البكتيريا الموجود في المجال الواحد في عدد المجالات ونستخرج عدد البكتيريا الموجودة في عينة الحليب وهي 0.01 مل والمفروشة على مساحة 1 سم^2 ثم يضرب الرقم الأخير في 100 لكي نستخرج عدد البكتيريا الموجودة في 1 مل من الحليب.

طريقة العمل:

1- نوضع السلايد الاعتيادي على ورقة خطوط بيانية أو ورقة مربعات ثم يتم رسم 1 سم^2 من جهتي السلايد أي في الوسط بالضبط.
2- تغسل الماصة من الداخل عدة مرات بالحليب وذلك لسحب كمية معينة من الحليب ومن ثم نفخهُ وبعدها نأخذ 0.01 مل من الحليب ونشرها على 1 سم^2 بالضبط بعد أن ترج العينة حوالي 20 مرة قبل أخذها لكي يحصل تجانس للحليب وكذلك يتم توزيع الخلايا البكتيرية في الحليب.
3- يترك السلايد ليجف في هواء المختبر ثم توضع على حمام مائي لمدة 5 دقائق وذلك كتثبيت الغشاء.

4- يرفع السلايد من الحمام المائي ويضاف إليه قطرات من الزايلول Xylol للتخلص من الدهن الموجود في العينة.

5- يصبغ السلايد بصبغة ازرق المثيلين لمدة نصف دقيقة ثم يتم التخلص من الصبغة بغسلها بتيار هادئ من ماء الحنفية.

6- يغسل السلايد بالكحول وذلك لإزالة الصبغة الزائدة ثم يغسل بالماء.

7- يترك السلايد ليجف في هواء المختبر ثم يفحص بالمجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم نضع قطرة من الزيت وننتقل بالفحص بالعدسة الزيتية الكبرى بعد ذلك يمكن حساب عدد البكتيريا الموجودة في 1 مل من الحليب.

عيوب طريقة العد الميكروسكوبي المباشر:

تعطي أعداد من البكتيريا أكثر من الحقيقية لأنها تعد الخلايا الحية والميتة معاً.

محاسن هذه الطريقة:

تعتبر طريقة سهلة وسريعة ولا تحتاج إلى أجهزة معقدة.

كيفية حساب مساحة المجال الميكروسكوبي:

يتم استخدام شريحة ميكرومترية Stage micrometer حيث تكون هذه الشريحة مقسمة إلى عدد من الخطوط وأن المسافة بين خط وخط هي 10 مايكرون، توضع الشريحة تحت العدسة الزيتية ويتم حساب عدد الخطوط التي تظهر تحت المجهر وهي 16 خط في المجال الميكروسكوبي الواحد.

مساحة المجال الميكروسكوبي الواحد (مساحة الدائرة) = نق^2 × ط

حيث أن قطر الدائرة سوف يكون 16 × 10 = 160 مايكرون.

وأن نصف القطر هو 80 مايكرون.

مساحة المجال الميكروسكوبي (مساحة الدائرة) = 80 × 80 × 3.14 = 20000 مايكرون مربع

هناك عدة مجالات في ال سم^2 الواحد.

$$\text{عدد المجالات} = \frac{\text{مساحة المربع}}{\text{مساحة المجال الواحد}} = \frac{1\text{سم}^2}{20000} = \frac{10000 \times 10000}{20000}$$

= 5000 عدد الخلايا البكتيرية في المجال الميكروسكوبي

كل 1 سم= 10000 مايكرون.

نأخذ عدد من المجالات والتي يجب أن لا تقل عن 10 مجالات وليكن 15 مجال حيث يتم أخذ أعداد البكتيريا في هذه المجالات ولتكن 1500 خلية بكتيرية ثم نأخذ متوسط هذه الأعداد وذلك بقسمة عدد البكتيريا على عدد المجالات التي تم قراءة أعداد البكتيريا فيها وهي

1500 ÷ 15 = 100 خلية بكتيرية.

نضرب متوسط عدد البكتيريا × عدد المجالات الكلية ينتج عدد البكتيريا في 0.01 مل المستخدمة في الفحص وكما يلي:

100 × 5000 = 500000 خلية في عدد المجالات الكلي والموجودة في 0.01 مل حليب.

500000 × 100 = 50000000 عدد الخلايا في 1 مل حليب.

ماهو الفرق بين الطرق المباشرة وغير المباشرة

ت	طرق العد المباشر	طرق العد غير المباشر
1	تستخدم في عد الأحياء المجهرية في عينات معينة كالحليب	تستخدم في عد الأحياء المجهرية في كافة أنواع العينات (التربة، الحليب)
2	لا يمكن تمييز الخلايا الميتة عن الخلايا الحية	تعد طريقة خاصة لحساب عدد الأحياء المجهرية الحية في العينة فقط دون الميتة ألن الأخيرة ال تكون مستعمرات في الأوساط الزرعية
3	تعد طريقة سريعة في عد الأحياء المجهرية	تحتاج هذه الطريقة إلى وقت أطول
4	لا يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والأعفان	يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والأعفان وذلك بتغيير الوسط الغذائي A.N واستخدام الوسط PDAبدالً عنه والخاص بتنمية الخمائر والأعفان
5	لا يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء المجهرية حسب درجات الحرارة الملائمة لنموها	يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء المجهرية حسب درجات الحرارة الملائمة فمثلاً: البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic أو البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة Mesophilic وذلك بحضن الأطباق في درجات الحرارة الملائمة لنموها

الدرس العملي السابع

ب- عد البكتيريا بطريقة الأطباق المصبوبة:

تستخدم هذه الطريقة في عد الخلايا الحية فقط باستعمال وسط غذائي لتنمية البكتيريا حيث يتم في هذه الطريقة إجراء سلسلة من التخفيفات للحليب والتي هي عبارة عن أنابيب اختبار تحتوي على 9 مل من الماء المقطر المعقم أو قناني تحتوي على 9 مل من الماء المقطر المعقم وبعد إجراء التخفيفات المطلوبة ينقل 1 مل من العينة المخففة إلى كل طبق من أطباق بتري المعقمة ثم يصب الوسط الغذائي (المرق المغذي) Nutrient Agar (N.A) في الطبق ويترك ليتصلب ومن ثم تنقل الأطباق إلى 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 (1مل) من التخفيف.

بعد ذلك تضرب عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف لكي نحصل على عدد البكتيريا في (1مل) من العينة الأصلية من دون التخفيف. سيلاحظ تناقص اعداد المستعمرات الناتجة بهذه الطريقة بسبب عملية التخفيف والذي سيساعد على الحصول على مستعمرات معزولة بصورة جيدة.

هناك طريقة أخرى تقع ضمن الأطباق المصبوبة تسمى طريقة الأطباق المصبوبة مسبقاً وهي كما يلي:

يؤخذ طبق بتري معقم ويصب بداخلهُ الوسط الغذائي ويترك ليتصلب ثم يؤخذ حجم معين من العينة والتي هي 0.1 مل من العينة المخففة وتفرش على سطح الآكار المتصلب ثم تنقل الأطباق إلى الحاضنة بعد وضعها بشكل مقلوب وتترك لمدة 24 ساعة ثم يتم حساب عدد المستعمرات النامية على سطح الآكار فتمثل أعداد البكتيريا في 0.1 مل من العينة المخففة ويضرب هذا العدد × 10 ليمثل أعداد البكتيريا الموجودة في 1 مل من العينة المخففة ومن ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف ليمثل أعداد البكتيريا في 1 مل من العينة الأصلية.

طريقة العمل:

1- يحضر الوسط الغذائي N.A ويعقم في الاوتوكليف ويوضع في حمام مائي على درجة 50 م° لحين استخدامهُ.

2- يرج الحليب المراد عد البكتيريا فيه بشكل جيد ليتم توزيع البكتيريا فيه بشكل جيد ثم يؤخذ 1 مل منهُ ويضاف إلى أنبوبة اختبار حاوية على 9 مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف 10/1 وبعد أن يتم رج الأنبوبة هذه بشكل جيد يؤخذ منها 1 مل ويضاف إلى أنبوبة

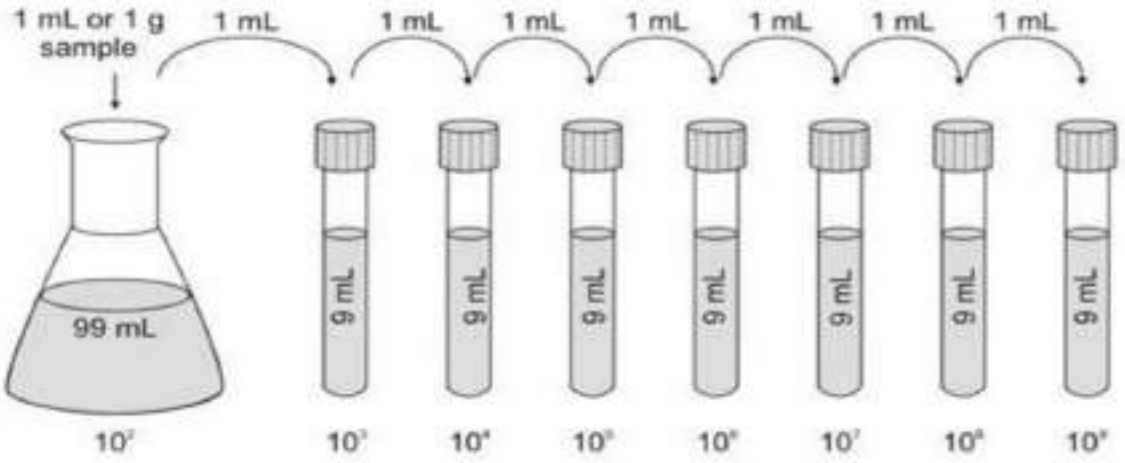
اختبار أخرى حاوية على 9 مل من الماء المقطر لنحصل على التخفيف 100/1 ونستمر بإجراء التخافيف إلى أن نصل إلى التخفيف 100000/1.

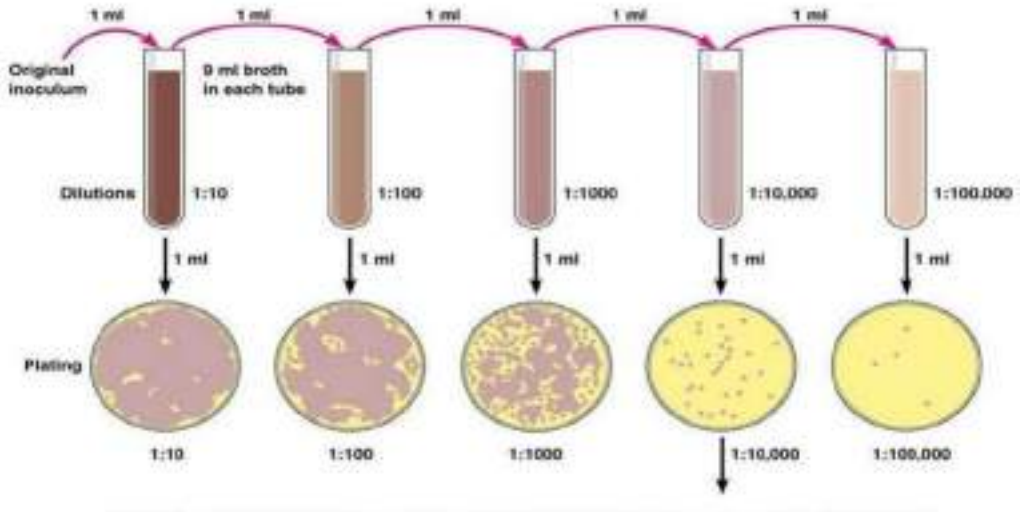
3- يؤخذ 1 مل من اخر تخفيفين وتنقل إلى أطباق بتري معقمة ويصب عليها الوسط الغذائي الموجود في الحمام المائي على 50 م° ويحرك الطبق بشكل الرقم ثمانية ليتم مزج العينة مع الوسط الغذائي ثم تترك الأطباق ليتصلب الوسط الغذائي وتنقل إلى الحاضنة وتوضع بشكل مقلوب على 35 م° لمدة 24 – 48 ساعة.

4- تعد المستعمرات النامية والتي تكون بين 30 – 300 مستعمرة ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف فنحصل على اعداد البكتيريا الموجودة في 1 مل من الحليب.

من محاسن هذه الطريقة هي: عد الخلايا الحية فقط

ملاحظة: تضع الأطباق في الحاضنة بشكل مقلوب لكي لا تتكون قطرات من البخار والتي سوف تتكثف وتتحول إلى ماء وتسقط على سطح الآكار مما يؤدي إلى صعوبة عد المستعمرات الموجودة على سطح الآكار.





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

الدرس العملي الثامن

طرق التعقيم

تعريفه:

هو إزالة أو إبادة لجميع الميكروبات في صوتها الخضرية أو في صورة جراثيم الموجودة من الوسط المراد تعقيمه سواء كان الوسط محاليل مختلفة أو بيئة غذائية أو مسطحات محدودة في أحجامها وأبعادها وعادة يتم التعقيم بأتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية.

هناك عدة أنواع من التعقيم منها:

1- التعقيم باستخدام أفران الهواء الساخن:

حيث ترتفع درجة حرارة الهواء كهربائياً أو غازياً إلى 160 – 180°م، وتترك الأدوات في الفرن من2-3 ساعات حيث يتم قتل الأحياء المجهرية نتيجة التغير السريع الذي يطرأ على خلاياها وكذلك نتيجة أكسدة محتويات الخلية. تتبع هذه الطريقة لتعقيم الأدوات والزجاجيات مثل الماصات وأطباق بتري، وبعد التعقيم يترك المعقم بعض الوقت حتى يبرد ثم يفتح ونستخرج منها الأدوات حتى لا تبرد فجأة مما قد ينشأ عنه احتمال كسرها وتلويثها.

2- اللهب المباشر:

يستخدم مصباح بنزن في تعقيم أبر التلقيح Loop التي تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة وكذلك الشرائح الزجاجية وفوهة الأنابيب وفوهة الدورق.

3- التلهيب الكحولي – Alcohol flaming:

يستخدم لتعقيم المشارط والسكاكين والمقص والهاون الخزفي وذلك بغمرها بكحول الإيثانول ثم حرقها باللهب المباشر فيشتعل ما علق بها من الكحول ويعمل على قتل الأحياء المجهرية.

4- التعقيم بالحرارة الرطبة:

استغلال بخار الماء في إجراء التعقيم بدلاً من الهواء الساخن ويستخدم بخار الماء مباشرة أو أن يضغط إلى درجة تصل ضعف الضغط الجوي العادي حيث تزداد درجة الحرارة للبخار تحت الضغط المرتفع.

5- معقم أرنولد:

عبارة عن وعاء معدني (بشكل فرن الهواء الساخن) مبطن بطبقة عازلة للحرارة ذو رفوف لوضع البيئات والمحاليل المراد تعقيمها وتكون مثقبة لتسهيل تسريب البخار إلى كل أجزاء الجهاز وله فتحة من قمته يوضع بها محرار لقياس درجة الحرارة داخل جهاز التعقيم فيتم التعقيم في هذا النوع على ثلاث فترات في ثلاثة أيام متتالية ويعرف التعقيم في هذه الحالة بالتعقيم المتقطع ، وأن الفكرة الأساسية في التعقيم المتقطع هو أن الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية النابتة

تهلك عندما تتعرض لبخار الماء (100°م) لمدة نصف ساعة أما الجراثيم الداخلية الناضجة غير النابتة فأنها تقاوم هذه الحرارة حتى لو تعرضت لها لمدة طويلة تصل لعدة ساعات وكذلك ترك البيئة بالحضانة أو بالغرفة لمدة 24 ساعة يسمح للجراثيم المقاومة للحرارة بأن تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم في اليوم التالي.

6- **الأوتوكليف** (التعقيم بالبخار مع الضغط):

تعتبر هذه العملية من أحسن وأسرع وسائل التعقيم لقدرة الحرارة الرطبة على الاختراق ، يستغل بخار الماء في الأوتوكليف لأن زيادة الضغط في داخل الجهاز تزيد من حرارة التعقيم حيث أن فاعلية الاوتوكليف في التعقيم ترجع على الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط ويجب أن يصل البخار إلى تلك المادة فأن عملية التعقيم لا تخرج عن كونها عملية للتعقيم الحراري على درجة 121°م لمدة ربع ساعة الأمر الذي لا يكفي للتعقيم حتى بالحرارة الجافة ويحدث هذا إذا أقفلت الأوعية بسدادات شديدة الأحكام (سدادات مطاطية) أو قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكميات الكبيرة من التربة لعدم وصول البخار إليها ولهذا يستخدم القطن في سد الأوعية أثناء تعقيم المواد لأنه مسامي يسمح بمرور البخار من خلاله.

الدرس العملي التاسع

الفحص الميكروبي للمياه

بالإضافة إلى استخدام المياه العذبة النظيفة للشرب فهي ذاتها تستخدم في تصنيع كثير من الأغذية فمثل هذه الأغذية يجب أن تكون نظيفة وخالية ليس من الميكروبات المرضية فحسب بل ومن الميكروبات التي تسبب الفساد للأغذية التي يدخل الماء في تصنيعها أو تنظيفها.

أن تزايد استخدام الماء العذب وأحياناً تبذيره يقترن جنباً إلى جنب إلى تزايد المياه القذرة والملوثة من فضلات الإنسان والحيوانات والصناعة التي غالباً ما ترمى في مصادر المياه العذبة كالأنهار والبحيرات قبل معاملتها وتعقيمها، بذلك أصبحت المياه في الطبيعة أكثر تلوثاً من السابق مما يتطلب معاملات تعقيمية أكثر فعالية للمياه التي تستخدم للشرب والصناعة.

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

طريقة العمل:

1- أخذ العينات

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

2- تحضير العينات

قبل البدء في إجراء الفحص على عينات المياه مباشرة تخض القنينة التي تحتوي على عينة الماء ما لايقل عن 25 مرة ثم تجرى التخفيفات اللازمة (يعتمد ذلك على مدى تلوث الماء تحت الدراسة) 10/1 و100/1 و1000/1 أو أكثر ثم تخض التخافيف مباشرة قبل نقل الماء للزراعة جيداً ولغاية 25 مرة.

3- الفحص عن بكتريا القولون Coliform

أ- الفحص الاحتمالي:

يوضع مقدار 1 سم^2 من كل من الماء قيد الدراسة من التخافيف المعينة في أنابيب تخمر fermentation tubes تحوي سائل اللاكتوز. تحضن الأنابيب على درجة حرارة 35م° لمدة 24 ساعة ثم يلاحظ تكون الغاز أم لا. إذ أن تكوين الغاز دليل على وجود مجموعة بكتريا القولون الاحتمالي. وتحضن الأنابيب التي لم يتكون الغاز فيها لمدة 24 ساعة آخرى فإذا تكون الغاز يكون دليلاً أيضاً على وجود بكتريا القولون. والأنابيب التي لم يتكون بها الغاز يكون دليلاً على عدم وجود بكتريا القولون فيها.

ب- الفحص التأكيدي

في هذا الفحص يستخدم أحد الأوساط الغذائية التالية brilliant green lactose bile broth، Eosin methylene blue (E M B)، ENDO agar. حيث تجرى عملية التلقيح التأكيدي على كافة الأنابيب التي يظهر فيها الغاز بعد 24 ساعة في الفحص الاحتمالي أعلاه.

تجرى عملية التلقيح على السطح وبطريقة التخطيط Streak على الأوساط المتصلبة في أطباق بتري وتحضن على درجة 35م° لمدة 24 ساعة ثم تفحص الأطباق عن وجود مستعمرات القولون المثالية وبذلك يعتبر الفحص التأكيدي إيجابي وإذا كانت أشكال المستعمرات غير مثالية يجرى الفحص التكميلي عليها.

جـ- الفحص التكميلي

يختار عدة مستعمرات من بكتريا القولون المثالية وعد مستعمرات غير مثالية من على الأوساط الغذائية في الفحص التأكيدي وتنقل المستعمرات على انفراد وتزرع في أنابيب تخمر تحتوي على سكر اللاكتوز وعلى أنابيب اختبار تحوي على الوسط Nutrient agar بشكل مائل وبطريقة التخطيط Streak.

يفحص عن تكون الغاز في أنابيب التخمر ومايكروسكوبياً بعد عملية التصبيغ بصبغة كرام. فإذا تكون الغاز في أنابيب التخمر وكان التصبيغ سلبي Gram negative وأن البكتريا غير سبورية وذات شكل عصوي يعتبر دليلاً مقنعاً للفحص التكميلي على تواجد بكتريا القولون في عينة الماء تحت الدراسة.

4- فعل البكتريا في المياه على حليب اللتموس

تلقح أنبوبة تحوي على حليب اللتموس بمقدار 0,1 مل من الماء قيد الدراسة ثم يحضن على درجة حرارة 30 –32 م° لمدة 2 – 5 يوم ولاحظ تغير لون حليب اللتموس. اعمل شريحة من حليب اللتموس وافحصها مجهرياً.

5- العد البكتيري للماء

يوضع مقدار 0,1 مل من الماء قيد الدراسة وتخفيفاته الملائمة في كل من أربع أطباق بتري يصب الوسط Plate count agar. يحضن طبقان من كل معاملة ذات أربع أطباق على درجة حرارة 30 – 32م° لمدة يومين ويحضن الطبقان الآخران على درجة حرارة 7 م° لمدة 10 أيام.

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