مبادئ الاحياء المجهرية(العملي)

اعداد : م.م ايناس منير العبيدي

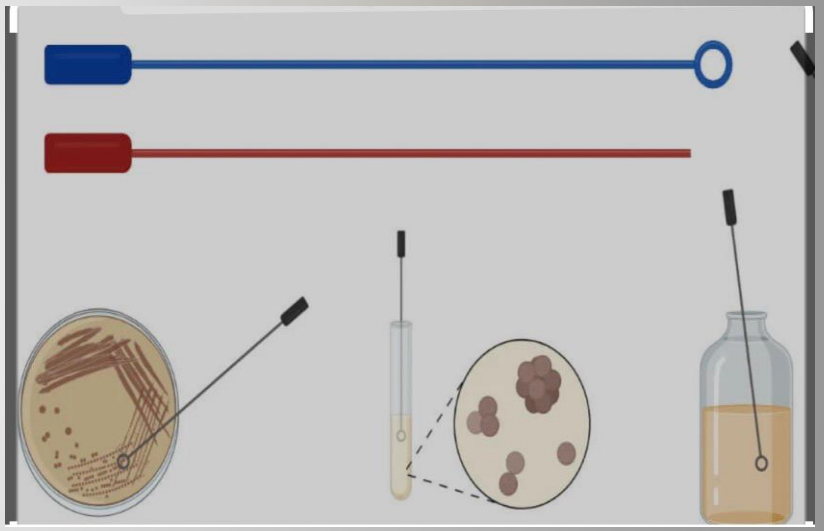
فهرس المنهج العملي

التسلسل	موضوع الدرس
الدرس الأول	ماذا تعني مادة الاحياء المجهرية ؟ وماهي اهم الأدوات التي يجب التعرف عليها داخل مختبر الاحياء المجهرية
الدرس الثاني	شرح كيفية إدارة الوقت ووضع الجدول الأسبوعي بكفاءة
الدرس الثالث	التعرف على المجهر وكفية استخدامه
الدرس الرابع	تصبيغ البكتريا
الدرس الخامس	التصبيغ بواسطة acid fast stain
الدرس السادس	تصبيغ السبورات
الدرس العملي السابع	ممارسة عملية للطلبة لشرح احد أجهزة مختبر الاحياء المجهرية

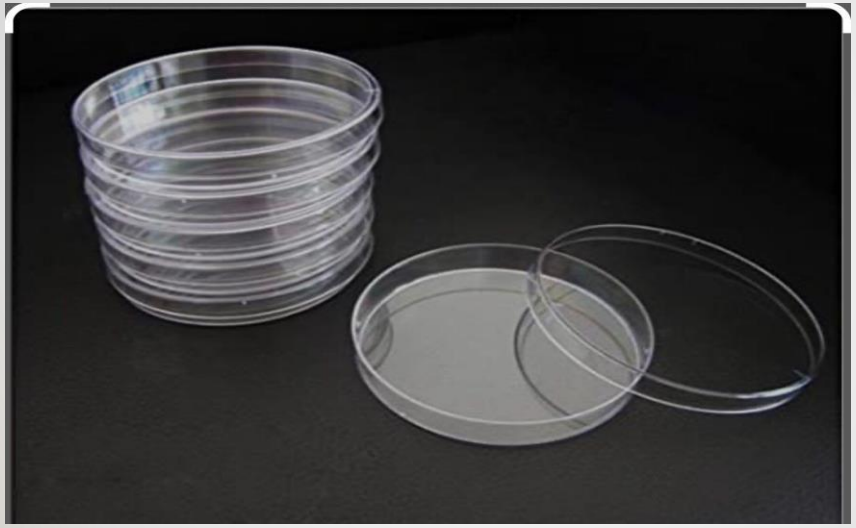
فهرس المنهج العملي

التسلسل	موضوع الدرس
الدرس العملي الثامن	فحص حركة البكتريا بواسطة القطرة المعلقة
الدرس العملي التاسع	طرق عد البكتريا
الدرس العملي العاشر	العد بطريقة الاطباق المصبوبة
الدرس العملي الحادي عشر	طرق اخذ العينات
الدرس العملي الثاني عشر	طرق التعقيم
الدرس العملي الثالث عشر	الفحص الميكروبي للماء
الدرس العملي الرابع عشر	الأوساط الغذائية

الدرس العملي الأول
اهم الأدوات اللازمة لمختبر الاحياء المجهرية

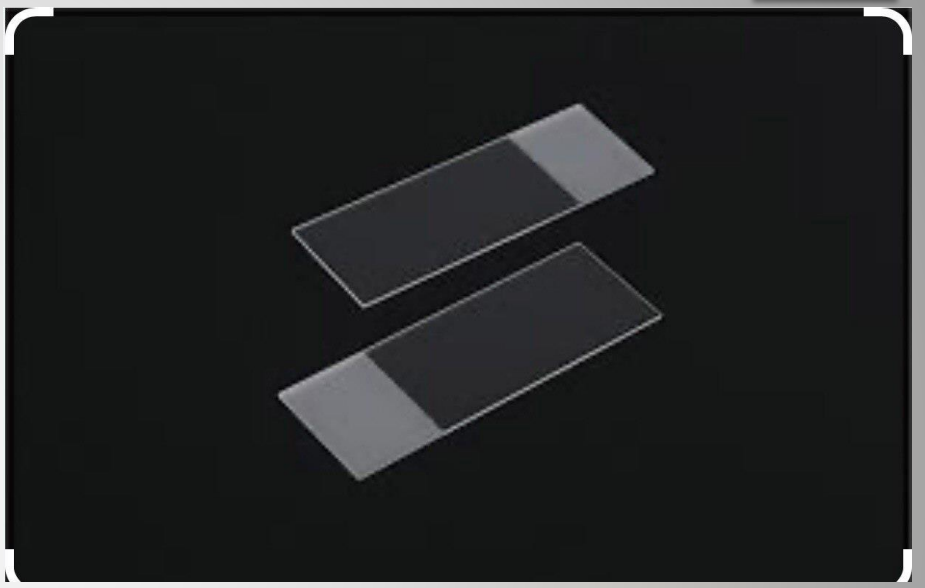


ابرة تلقيح



بتري دش(بيت البكتريا)

جهاز التعقيم بالبخار



شرائح الفحص المجهري

مزارع للإحياء المجهرية(بكتريا وفطريات)

رحلة الالف ميل تبدا بخطوة واحدة

دائما البداية خطوة ثم يتضح الطريق

الدرس العملي الثاني

شرح مصفوفة إدارة الوقت وترتيب الأولويات لغرض تعريف الطلب بأهمية استغلال وقتهم بشكل فعال وإنجاز المطلوب منهم خلال السنة الدراسية

الدرس العملي الثالث

المجهر Microscope

هناك عدة انواع من المجاهر :

المجهر الضوئي (البسيط والمجهر المركب) والذي يستخدم لغرض فحص الاحياء المجهرية وأيضا فحص مكونات الخلية .

والمجهر الإليكتروني والذي يستخدم لفحص الفايروسات والأمور الدقيقة جدا . 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 :-

1- قاعدة الميكروسكوب.

-2- الحامل - الذي يتركب على القاعدة.

-3- الذراع والتي يحمل بواسطتها المكروسكوب وهي توجد في اسفل الحامل

- 4-المسرح - حيث توضع الشريحة المراد فحصها عليه ويوجد في اعلى الحامل. 5- الانبوبة او الانبوب -: وتحمل في اعلاها العدسة العينية او العدستان العينيتان وتحمل في اسفلها العدسة الشيئية التي تكون مركبة عليها.

6- القطعة الانفية والتي يمكن تحريكها حركة دائرية للانتقال من عدسة الى اخرى وهي تركب على الذراع.

7 - المنظم الكبير (التقليدي) وهو يوجد على الذراع.

8 - 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 :-

1- العدسة العينية: وظيفتها تكبير صورة الجسم المرئي الحقيقية الناتجة من العدسة الشيئية وتكون قوة تكبيره 10 مرات

2 العدسة الشيئية: وهي عادة تكون ثلاث عدسات وظيفتها تكوين صورة حقيقية معكوسة ومكبرة داخل جزء الانبوبة العلوي وتكون قوة تكبير العدسة الصغيرة 10 مرات وبعدها البؤري 61 ملم والعدسة الكبيرة و قوة تكبيرها 40 مرة وبعدها البؤري من 4-3.2 ملم والعدسة الكبيرة الزيتية تكون قوة تكبيرها 100 مرة وبعدها البؤري 1.8 ملم والتي يجب عند استعمالها استخدام قطرة من الزيت الخاص بها ويوجد نوع من زيت السيدر كبديل عن زيت العدسات.

3- 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

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

طريقة الفحص بالمايكروسكوب المركب

1- يتم تشغيل المصباح الكهربائي للحصول على اكبر كمية من الضوء في المجال الميكروسكوبي .

وتتم هذه العملية كما يلي (رفع المكثف الى اعلى ما يمكن وفتح الحجاب على اخره استخدم العدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير 10 مرات الى ان نحصل على اكبر كمية من الإضاءة).

2 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.

-3 ننتقل الى العدسة الزيتية الكبرى التي قوة تكبيرها 100 مرة مع وضع قطعة من الزيت 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 :-

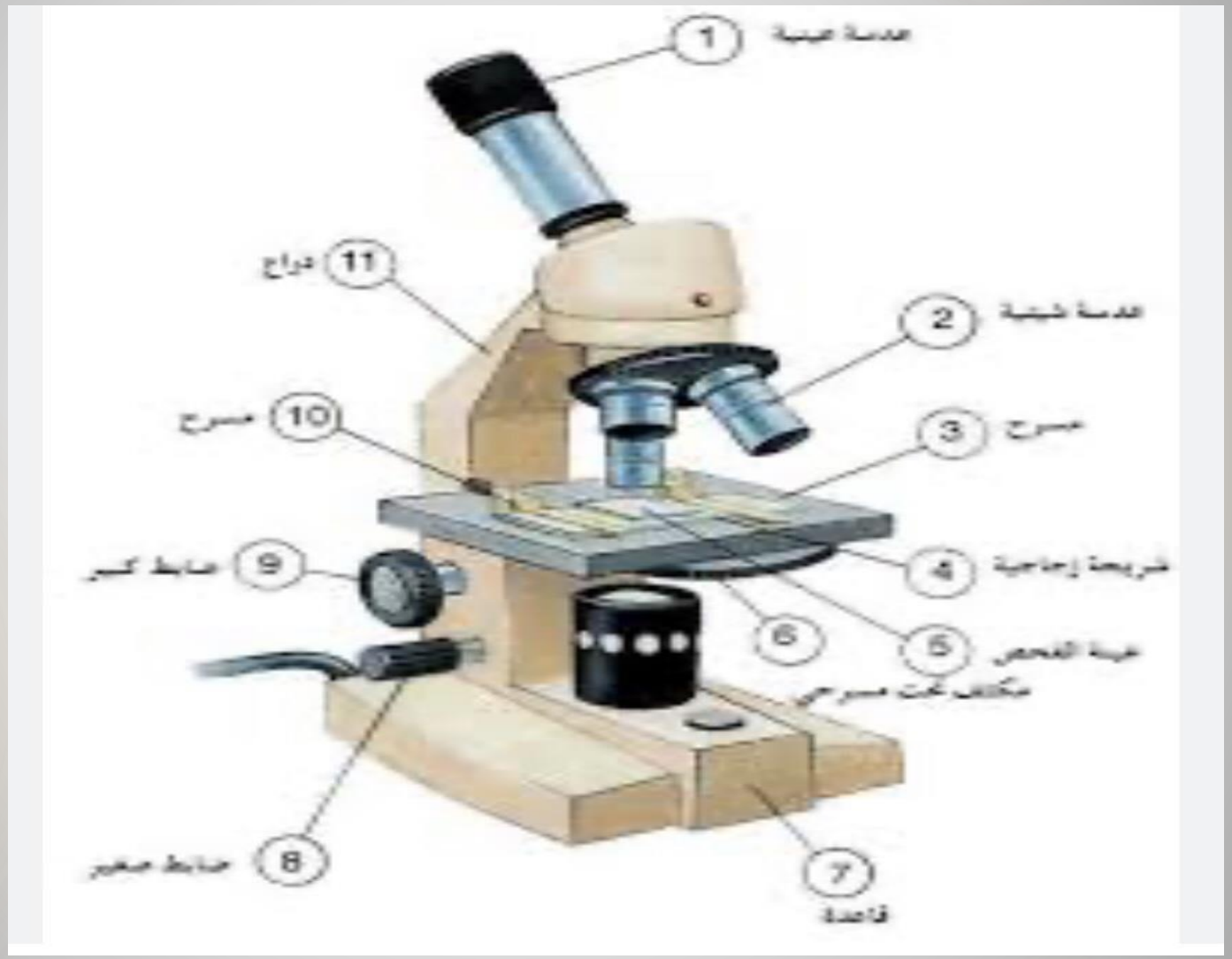
1- يجب التاكد من نظافة العدسات والمكثف قبل البدء بالعمل .

-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 ازالة الزيت المتبقي على العدسة باستخدام اوراق تنظيف العدسات المبللة بالزايلول الان 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 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.

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



1 عدسة عينية
2 عدسة شيئية
3 مسرح
4 شريحة زجاجية
5 عينة الفحص
مكثف تحت مسرحي
6
7 قاعدة
8 ضابط صغير
9 ضابط كبير
10 مسرح
11 ذراع

الدرس العملي الرابع

تصبيغ البكتريا :- Staining of bacteria

الغرض من الدرس هو دراسة اشكال وتجمعات البكتريا بعد صبغها بإحدى الصبغات الخاصة الغرض وأيضا التدريب على كيفية استخدام الميكروسكوب في فحص السلايدات المصبوغة بهذه الطريقة وقبل اجراء عملية التصبيغ سواء كان تصبيغ بسيط أو بأي طريقة اخرى فيجب تحضير ما يسمى بالغشاء البكتيري ويكون من المهم جدا معرفة تحضير هذا الغشاء وتثبيته على الشريحة.

طريقة تحضير الغشاء :-

-1- تغسل الشريحة المستعملة بالماء والصابون ثم تغمر بالكحول ومن ثم تمرر على اللهب لحرق الكحول بهدف تعقيم الشريحة الزجاجية ثم تبرد قبل الاستعمال . ملاحظة اذا مع كانت الشريحة جديدة فانها لا تحتاج الى هذه الخطوات .

-2- تعقم ابرة التلقيح (اللوب) على لهب مصباح بنزن ثم تترك لتبرد قبل ان تؤخذ مسحة من المزرعة النقية المراد فحصها بعد أن ترج بشكل جيد اذا كانت المزرعة سائلة . 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 1 سم ثم تترك لتجف بهواء المختبر للحصول على غشاء رقيق.

-3- بعد جفاف الغشاء تمرر الشريحة على اللهب عدة مرات والغرض من هذه العملية هي قتل الخلايا البكتيرية والعمل على التصاقها على الشريحة وهي ما يسمى (الغشاء البكتيري).

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

أنواع التصبيغ

-1- التصبيغ البسيط Simple staining

يتم هذا النوع من التصبيغ باستخدام صبغة واحدة فقط وعادة ما تستخدم صبغة ازرق المثيلين (مثيلين بلو) او باستخدام صبغة السفرانين وان طريقة التصبيغ هي :

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 نشاف.

3- يكون السلايد جاهز للفحص بواسطة الميكروسكوب حيث يتم الفحص اولا بالعدسة الشيئية الصغرى ذات قوة التكبير 10 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 أوضح صورة للخلايا الموجودة على السلايد

2. التصبيغ بطريقة كرام: Grams staining

اكتشفت هذه الطريقة من قبل العالم كرام عام 1884م والتي على اساسها تقسم البكتريا الى

قسمين هما :-

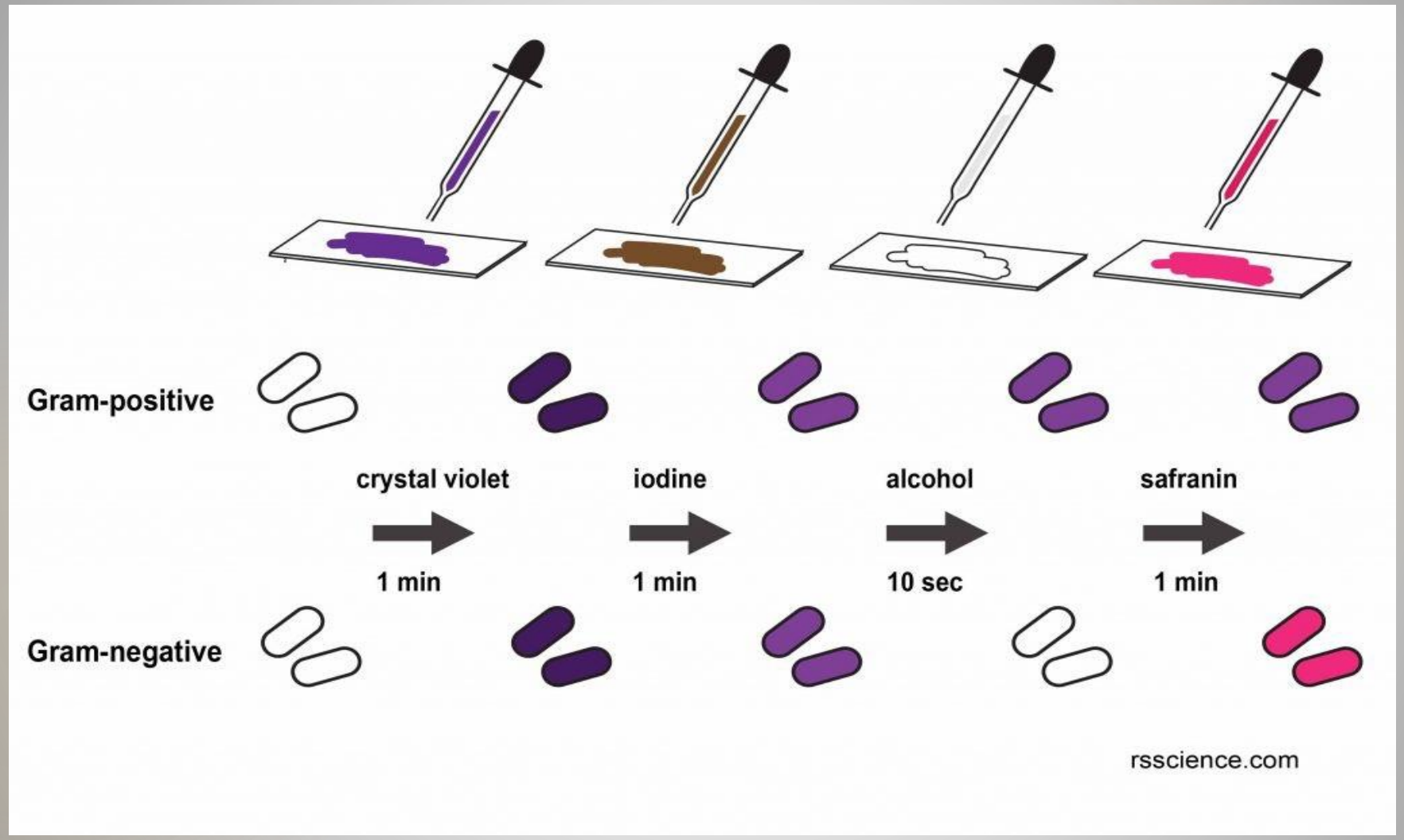
-1- البكتريا الموجبة لصبغة كرام : تظهر تحت المجهر باللون البنفسجي.

2 البكتريا السالبة لصبغة كرام: والتي تفقد صبغة الجنسيان البنفسجية وتعود لتصبغ بصبغة السفرانين الحمراء وتظهر تحت المجهر باللون الأحمر . -.

وقبل اضافة الكحول يجب استعمال محلول اليود الذي يعمل على تثبيت الصبغة البنفسجية حيث يتحد اليود

مع الصبغة مكون معقد الجنسيان - اليود الذي يترسب على جدار الخلية البكتيرية ويكون من

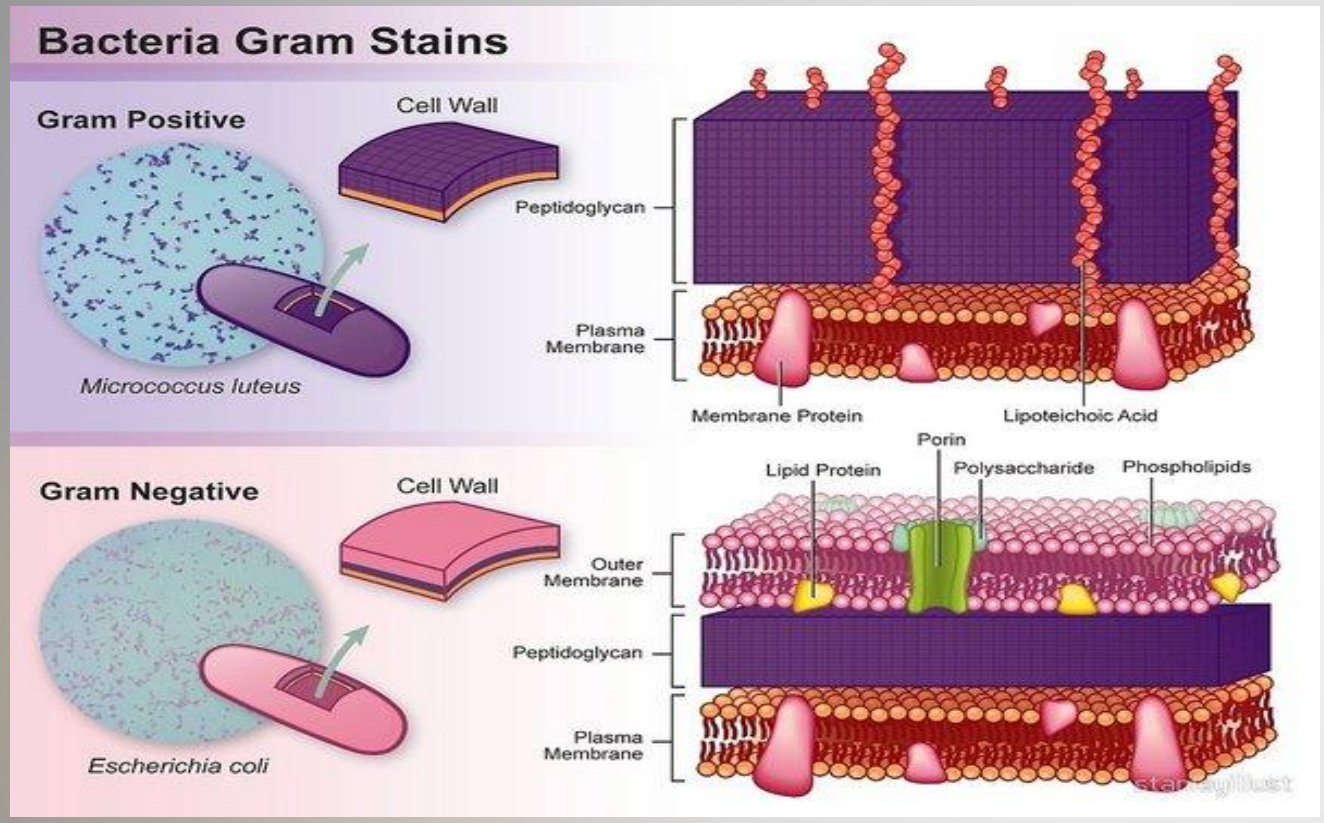
الصعب ازالته في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام بينما في البكتريا السالبة لصبغة كرام يسهل ازالتها.

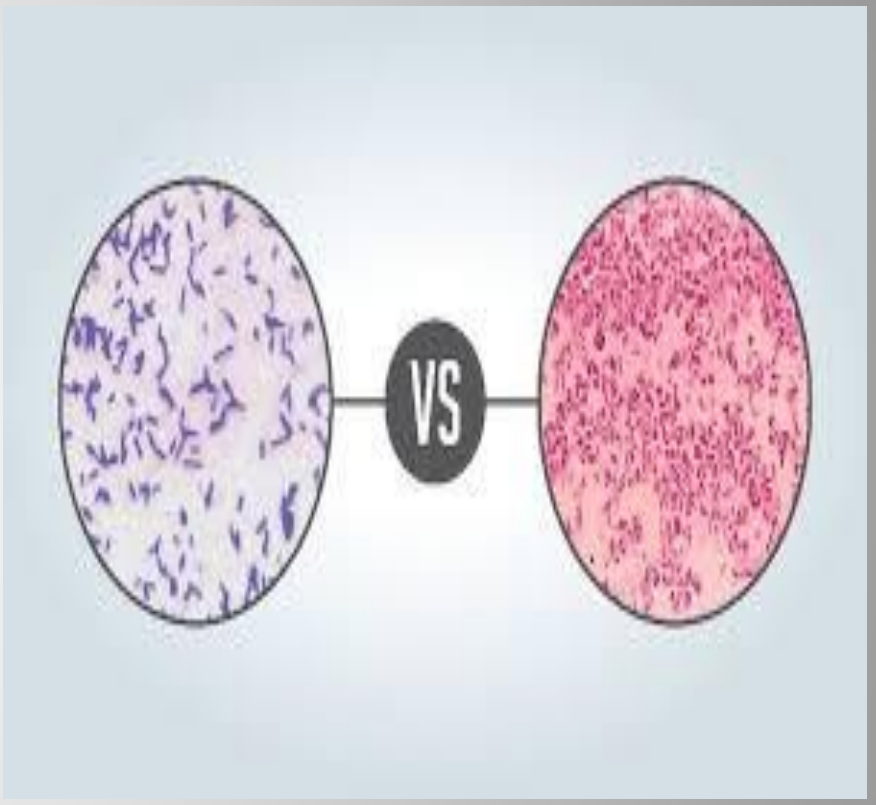

Gram-positive
crystal violet
1 min
iodine
1 min
alcohol
10 sec
safranin
1 min
Gram-negative
rsscience.com

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 يكمن 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.


Bacteria Gram Stains
Gram Positive
Cell Wall
Peptidoglycan
Plasma Membrane
Micrococcus luteus
Membrane Protein
Lipoteichoic Acid
Gram Negative
Cell Wall
Porin
Lipid Protein
Polysaccharide
Phospholipids
Outer Membrane
Peptidoglycan
Plasma Membrane
Escherichia coli


VS

طريقة العمل

1- يحضر الغشاء للبكتريا المراد اختبارها ويثبت على اللهب

2- يغمر الغشاء بصبغة الجنسيان البنفسجي لمدة 45 ثانية ثم بعد ذلك نتخلص من الزائد من الصبغة بغسلها بتيار من ماء الحنفية الهادئ .

3 - نغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة 45 ثانية فيتحد مع صبغة الجنسيان البنفسجي مكون معقد ثم بعد ذلك نغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية

4 - يغمر الغشاء بالكحول لمدة 20 ثانية ويفضل اضافة الكحول على شكل قطرات الى ان يصبح لون الكحول المزال بنفسجي فاتح وعلى ان لا تزيد الفترة عن 20 ثانية ثم يغسل

بماء الحنفية.

5 - يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء ولمدة 30 ثانية ومن ثم يتم التخلص من الصبغة الزائدة بغسلها بماء الحنفية .

6- يجفف السلايد بورق النشاف -7- 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 .

لا يصل ناجح الى القمة الا وتعثر ، لكنه يعرف انه سيصل

الدرس العملي الخامس
التصبيغ بطريقة Acid fast bacteria

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

1/ البكتريا صامدة للأحماض والتي سوف تنصبغ بصبغة الكاربون الحمراء carbon fuchsin ويكون من الصعب ازالتها من الخلية البكتيرية فتظهر تحت المجهر باللون الأحمر

2 البكتريا غير صامدة للأحماض 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 للأحماض 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 Acid fast bacteriaوالتي هي من نوع Mycobacterium tuberculosis

طريقة العمل:-

1- يحضر غشاء من البكتريا 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 وذلك بإضافة الصبغة باستمرار لان جفاف الغشاء قد يؤدي الى ازالته .

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

4- يغسل الغشاء باضافة الكحول المحمض الذي يضاف على شكل قطرات او باستخدام ماصة او بغمر الغشاء بالكحول لمدة 20-30 ثانية ثم يغسل بماء الحنفية للتخلص من

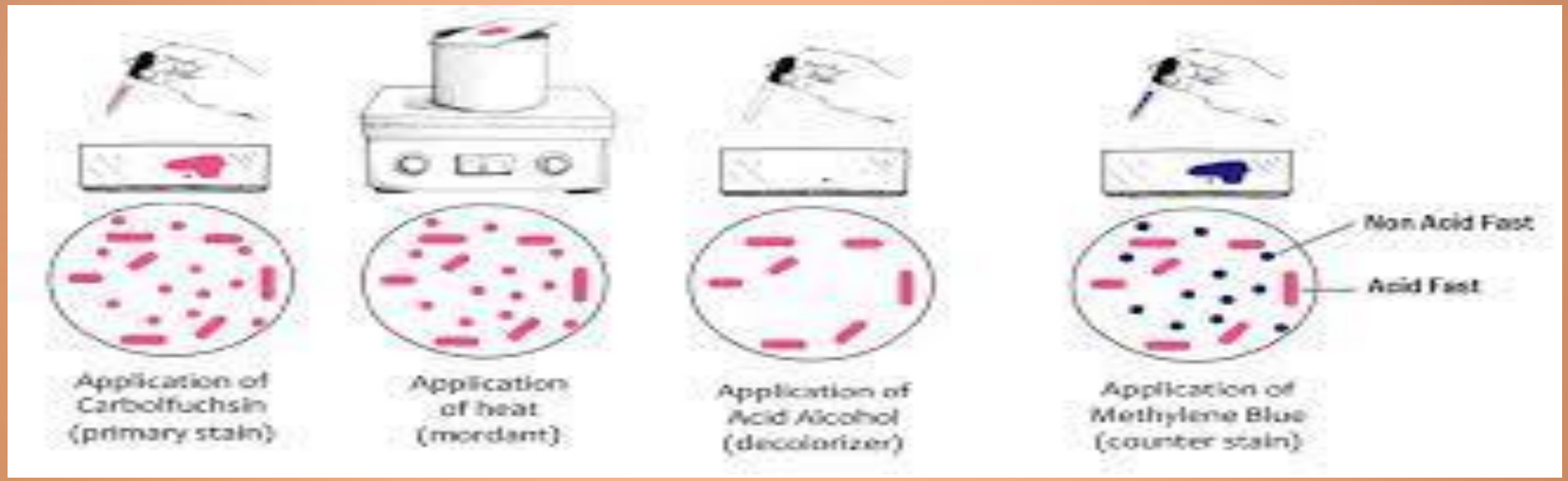
الكحول الزائد.

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 اولا ثم ننتقل بالفحص باستخدام العدسة الزيتية المنغمسة مع وضع قطرة من زيت السيدر.

صورة لايضاح خطوات طريقة العمل



الدرس العملي السادس

تصبيغ السبورات spores staining

بعض انواع البكتريا وخاصة البكتريا التابعة لجنس Bacillusولجنس Clostridiumيكون لها القابلية على مقاومة الظروف غير الطبيعية عن طريق تغيير شكلها من الخلية الخضرية الى ما يسمى بالسبور الداخلي Endo sporeوقد وجد ان بعض السبورات ممكن ان تبقى حية في ماء مغلي لمدة 2-3 ساعة بالإضافة الى مقاومة السبورات لبعض المواد الكيميائية والتي تستخدم في القضاء على الخلايا الخضرية ولا يمكن صبغ السبورات بالإضافة الاعتيادية الا اذا استخدمنا الحرارة كعامل مساعد يساعد اذ يعمل على نفاذ الصبغة الى داخل الخلية السبورية . واذا ما صبغت السبورات فانه يكون من الصعب جدا ازالة الصبغة منها هناك عدة طرق لصبغ السبورات وان من أكثر هذه الطرق شيوعا هو استخدام صبغة اخضر الملاكات Malachite Greenصب السبورات ويتم استعمال صبغة السفرانين Safraninلصبغ 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 بالإضافة الى وجود خلايا في طور التحول مصبوغة باللون الاحمر والاخضر

طريقة العمل :

1- يحضر غشاء من المزرعة البكتيرية المراد فحصها وتثبت على اللهب . المزرعة المفحوصة او المستخدمة يجب ان لا يزيد عمرها عن 24-48 ساعة .

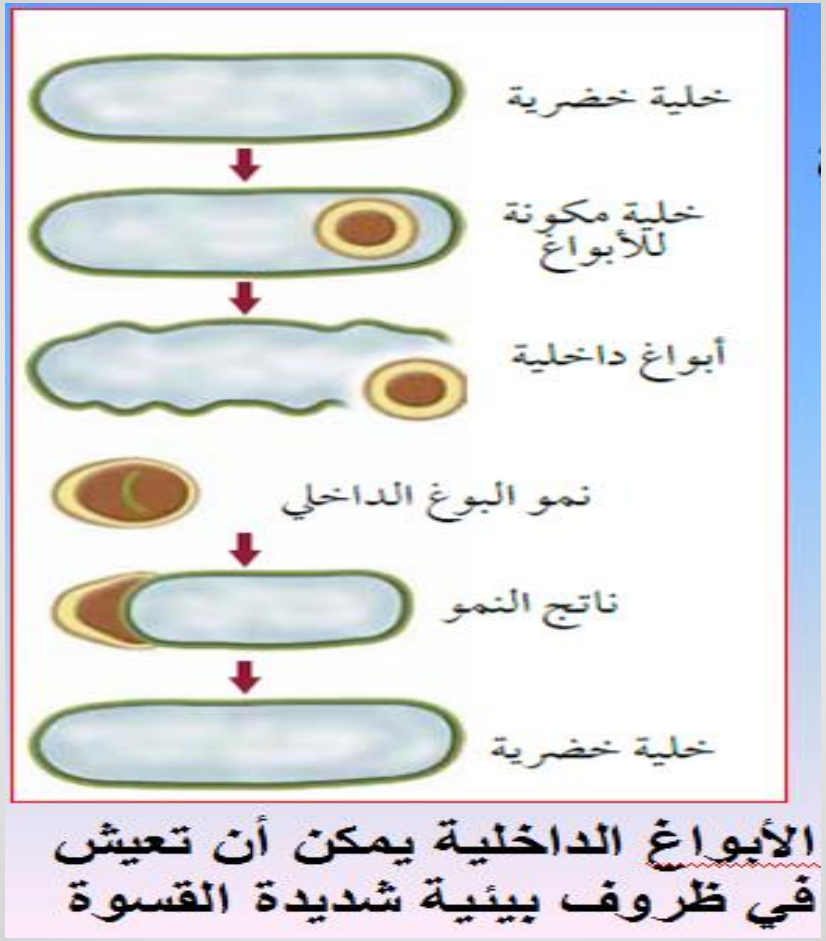
2 يوضع السلايد على حمام مائي في بيكر ثم يغمر الغشاء بصبغة اخضر الملاكايت ونستمر بالتسخين لمدة 5 دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الغشاء وذلك باضافة الصبغة بشكل مستمر لان عملية الجفاف تؤدي الى تلف الغشاء

-3 يبرد السلايد ثم يغسل بتيار هادئ من ماء الحنفية .

-4- يغمر الغشاء بصبغة السفرانين الحمراء لمدة 45 ثانية ثم يزال الزائد من الصبغة ويغسل بتيار من ماء الحنفية ثم يجفف الغشاء بواسطة ورق النشاف

-5 يفحص السلايد تحت الميكروسكوب باستخدام العدسة الشيئية الصغرى ثم بالعدسة اضافة قطرة من الزيت ونلاحظ اشكال والوان الخلايا والسبورات مع العدسة الزيتية المنغمسة التي سوف تظهر تحت المجهر

تكوين السبورات الداخلية



توقف عن احباط نفسك هذا الوقت سيمضي وستبتسم بعد كل ذكرى ثقيلة مضت

الدرس العملي السابع

ممارسة عملية للطلبة داخل المختبر يشرح فيها الطالب لزملائه كيفية استخدام جهاز مختبري متعلق بمختبر الاحياء المجهرية

الدرس العملي الثامن

فحص حركة البكتريا بواسطة القطرة المعلقة:

تكون البكتريا اما متحركة وتسمى Mobileاو غير متحركة وتسمى Non mobile. تتم حركة البكتريا بواسطة الاسواط Flagellaاما 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 24-48 ساعة.

طريقة العمل:

- 1- بواسطة ابرة التلقيح المعقمة يؤخذ 4 قطرات صغيرة جدا من ماء الحنفية وتوضع في الاركان الاربعة لغطاء السلايد Cover sliderالذي يكون موضوع على المنضدة
- 2 تؤخذ عقدة من المزرعة المراد فحصها وتوضع في وسط غطاء السلايد
- 3- 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.
- 4- يقلب ببطيء وعناية بحيث تكون القطرة معلقة في وسط الغطاء.
- 5- يفحص السلايد بالمجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم ننتقل بالفحص بالعدسة الجافة الكبرى ذات قوة التكبير 40 مرة مع تقليل الاضاءة لمشاهدة حركة البكتريا اذا كانت متحركة او ملاحظة سكونها اذا كانت ساكنة (غير متحركة).

اضغط هنا لمشاهدة الفيديو

https://www.youtube.com/watch?v=X0_0j-eRUxM&feature=youtu.be

الدرس العملي التاسع

طرق عد البكتريا :-

أ- طريقة العد الميكروسكوبي المباشر: طريقة Breed

تستخدم هذه الطريقة في حساب اعداد البكتريا في عينة من الحليب الخام لمعرفة جودة هذا الحليب ونوعيته ومدى تلوثه بالأحياء المجهرية او البكتريا وتتم هذه الطريقة بوضع كمية معروفة الحجم من الحليب والتي هي 0,01مل من الحليب والتي تفرش على مساحة معلومة من السلايد او الشريحة والتي هي 1سم 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 1 سم ثم يضرب عدد البكتريا الموجود في المجال الواحد في عدد المجالات ونستخرج عدد البكتريا الموجودة في عينة الحليب وهي 0.01 مل والمفروشة على مساحة 1سم ثم يضرب الرقم الآخر في 100 لكي نستخرج عدد البكتريا الموجودة في 1 مل من الحليب.

طريقة العمل

1- نوضع السلايد الاعتيادي على ورقة خطوط بيانية او ورقة مربعات ثم يتم رسم 1سم من جهتي السلايد اي في الوسط بالضبط.

2- تغسل الماصة من الداخل عدة مرات بالحليب وذلك لسحب كمية معينة من الحليب ومن ثم نفخه وبعدها ناخذ 0,01 مل من الحليب ونشرها على 1سم بالضبط بعد ان ترج العينة حوالي 20 مرة قبل اخذها 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 اليه قطرات من الزايلول Xylol للتخلص من الدهن الموجود في العينة .

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

-6- يغسل السلايد بالكحول وذلك لازالة الصبغة الزائدة ثم يغسل بالماء

7- 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 1 مل من الحليب

كيفية حساب مساحة المجال الميكروسكوبي:

ويتم استخدام شريحة ميكرومترية Stage micrometer حيث تكون هذه الشريحة مقسمة الى عدد من الخطوط وان 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) = نق2 xط

حيث ان قطر الدائرة سوف يكون 16×10= 160

وان نصف القطر هو80

مساحة المجال الميكروسكوبي (مساحة الدائرة) = 80*80*14.3 = 20000

هناك عدة مجالات في السم المربع الواحد

عدد المجالات =مساحة المربع ÷مساحة المجال الواحد

=1سم÷20000=10000*10000÷20000=5000

عدد الخلايا البكتيرية في المجال المكروسكوبي الواحد

ناخذ عدد من المجالات والتي يجب ان لا تقل عن 10 مجالات وليكن 15 مجال حيث يتم اخذ اعداد البكتريا في هذه المجالات ولتكن 1500 خلية بكتيرية ثم ناخذ متوسط هذه الاعداد وذلك بقسمة عدد البكتريا على عدد المجالات التي تم قراءة اعداد البكتريا فيها وهي 15÷ 1500=100 خلية بكتيرية

نضرب متوسط عدد البكتريا * عدد المجالات الكلية ينتج عدد البكتريا في 0.01 مل المستخدمة في الفحص وكما يلي

100*5000=500000 خلية في عدد المجالات الكلي والموجودة في 0.01مل من الحليب

100*500000=50000000مل من الحليب

عيوب الطريقة:

تعطي اعداد من البكتريا أكثر من الحقيقة لأنها تعد الخلايا الحية والميته معا

محاسن الطريقة :

تعتبر طريقة سهلة وسريعة و لاتحتاج الى أجهزة معقدة

يمكن استخدام شريحة خاصة والمستخدمة لعد كريات الدم الحمراء وتسمى شريحة بيتروف
Petrouff hausser counting chamber

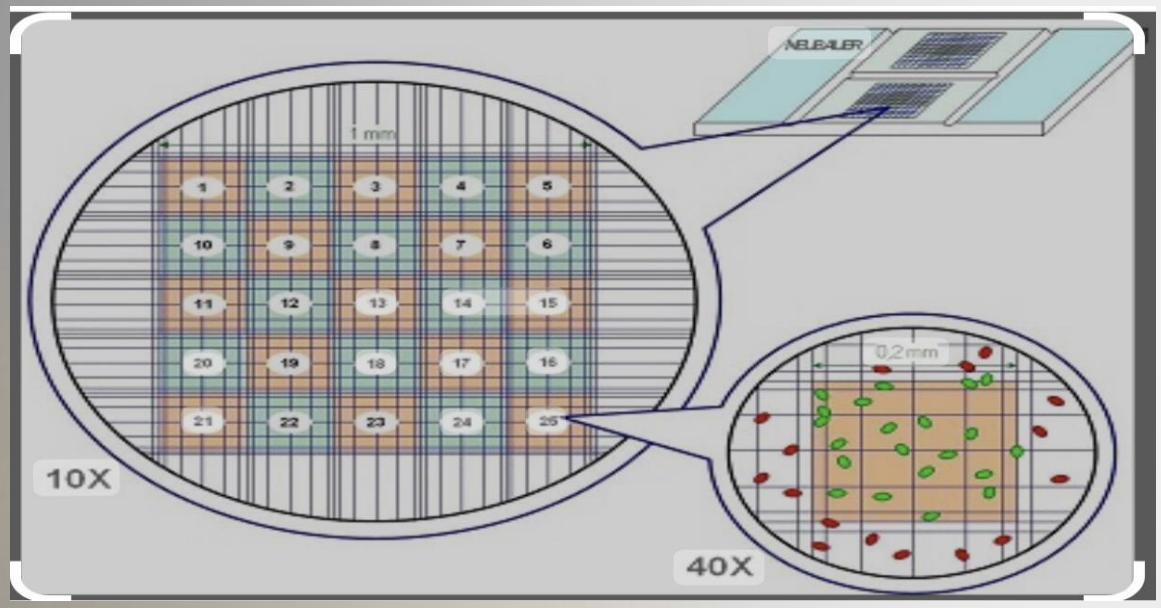
تحتوي على 25 مربع مساحة كل مربع 1/400 ملم2 تغطى الشريحة بغطائها فتترك مساحة قدرها 1/50 ملم ولذا يكون حجم السائل فيها معلوم وهو 1/20000 ملم3 فوق كل مربع وبذا بكون حجم المربع الواحد معلوم وعند حساب عدد الخلايا في المربع الواحد فتكون مثلا 100 يعني ان العدد هو 100 بكتيريا مضروبة ب 20000 ملم3 وبذا نحصل على العدد البكتيري في ملم3 واحد. ممكن تخفيف البكتيريا إذا كان عددها كبير.

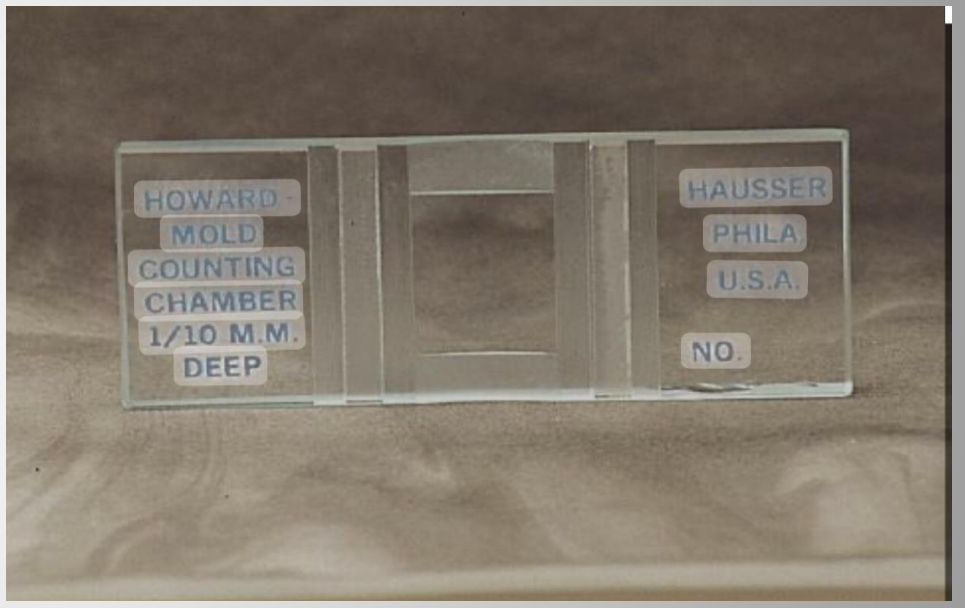
سلبيات هذه الطريقة هي:

صعوبة توزيع العينة على الشريحة بشكل منتظم

لا يمكن التمييز بين الخلايا الميتة والحية

صورة توضيحية لشريحة بيتروف





الدرس العملي العاشر

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 9 مل من الماء المقطر المعقم او قناني تحتوي على 99مل من الماء المقطر المعقم وبعد اجراء التخفيفات المطلوبة ينقل 1 مل من العينة المخففة الى كل طبق من اطباق بتري المعقمة ثم يصب الوسط الغذائي المرق المغذي N.A الحاضنة الى الطبق ويترك ليتصلب ومن ثم تنقل الاطباق الى 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 مقلوب التخفيف لكي نحصل على عدد البكتريا في (1مل) من العينة xالتخفيف . بعد ذلك تضرب عدد المستعمرات 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 0.1 مل من العينة المخففة وتفرش على سطح الاكار المتصلب ثم تنقل الاطباق الى الحاضنة بعد وضعها بشكل مقلوب وتترك لمدة 24 ساعة ثم يتم حساب عدد المستعمرات النامية على سطح الاكار فتمثل اعداد البكتريا الموجودة في 0.1 مل من العينة المخففة ويضرب هذا العدد × 10 ليمثل اعداد البكتريا الموجودة في 1 مل من العينة المخففة ومن ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف ليمثل اعداد البكتريا في 1 مت من العينة الاصلية

طريقة العمل :-

-1- يحضر الوسط الغذائي ويعقم في الاوتوكليف ويوضع في حمام مائي على درجة 50م لحين استخدامه.

2 - يرج الحليب المراد عد البكتريا فيه بشكل جيد ليتم توزيع البكتريا فيه بشكل جيد ثم يؤخذ 1 مل منه ويضاف الى انبوبة اختبار حاوية على 9مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف 10/1 وبعد أن يتم رج الانبوبة هذه بشكل جيد يؤخذ منها 1مل ويضاف الى انبوبة اختبار اخرى حاوية على 9مل من الماء المقطر المعقم لنحصل على التخفيف 100/1 ونستمر باجراء التخافيف الى ان نصل الى التخفيف 100000/1

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

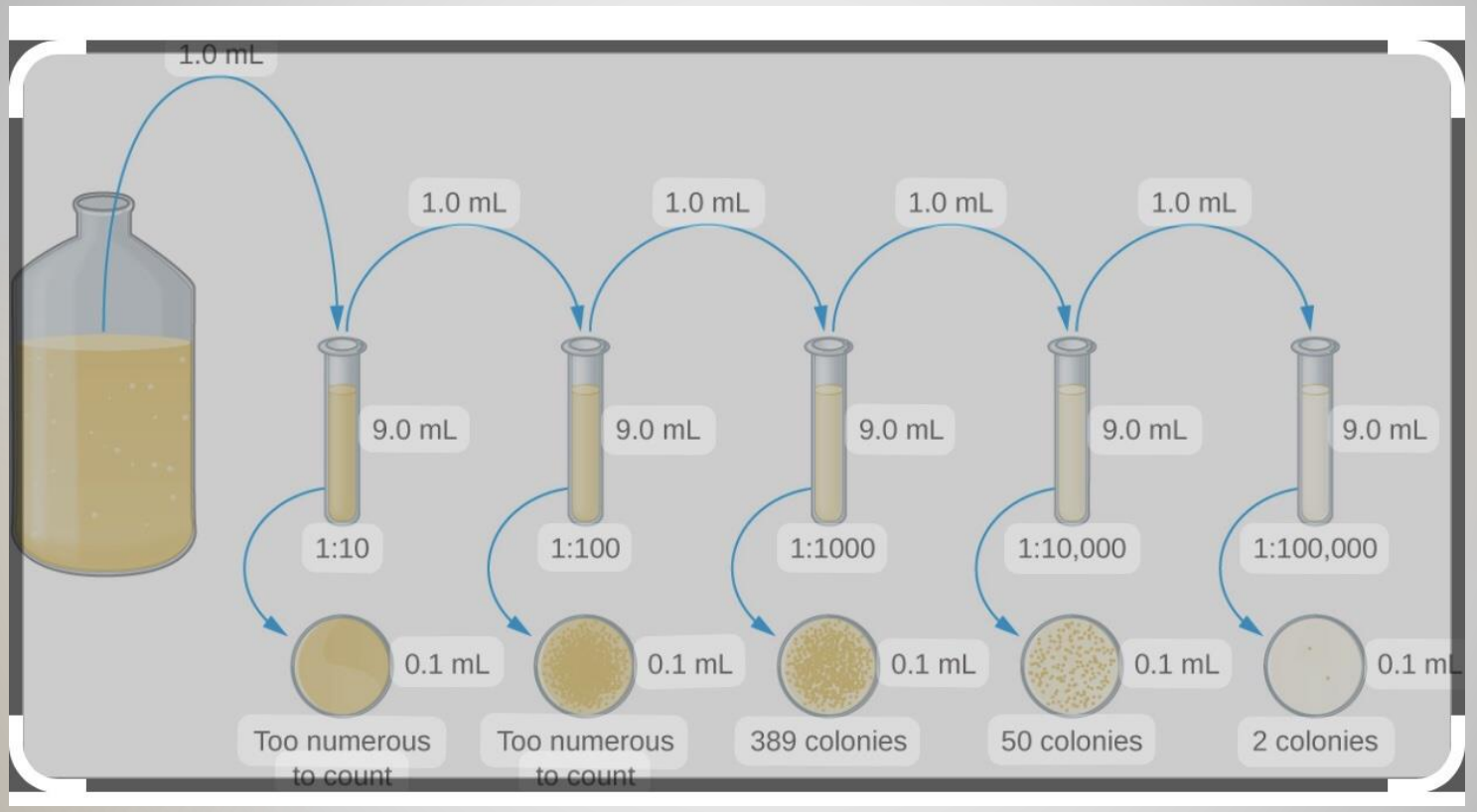
4 تعد المستعمرات النامية والتي تكون بين 300-300 مستعمرة ثم يضرب العدد في مقلوب التخفيف فنحصل على اعداد البكتريا الموجودة في 1 مل من الحليب

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 .

طريقة العد البكتيري الكلي



الدرس العملي الحادي عشر

شرح طرق اخذ العينات من مصادرها المختلفة (ماء –تربة _غذاء)

عينات ماء الاسالة

1- خذ زجاجة نظيفة ومعقمة بالاوتوكليف

2- افتح الصنبور مدة خمس دقائق

3- افتح غطاء الزجاجة بعد تعقيم فوهتها باللهب وتملئ بالماء مع ترك فراغ قليل في اعلى الزجاجة وتغلق الفوهة بعد تعقيمها أيضا وبعدها تجرى عليها الاختبارات اللازمة

عينات التربة

خذ زجاجة نظيفة ومعقمة

زن 50 غم من التربة واضف ما يعادلها ماء مقطر رج الخليط جيدا واتركه فترة نصف ساعة ثم قم باخذ امل منها واجري عليها التخافيف والفحوصات اللازمة

عينات الأغذية

خذ زجاجة نظيفة معقمة

زن اغم من عينة الغذاء المعينة واضف لها 9 مل ماء مقطر رج الخليط جيدا ثم خذ ا مل من العينة واجري عليها التخافيف والفحوصات الازمة

الدرس العملي الثاني عشر

طرق التعقيم :

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

وهناك عدة انواع من طرق التعقيم منها:

-1- التعقيم باستخدام افران الهواء الساخن حيث ترتفع درجة حرارة الهواء كهربائيا او غازيا الى 160-180م وتترك الادوات في الفرن من ساعة حيث يتم قتل الاحياء المجهرية نتيجة التغير السريع الذي يطرأ على خلاياها وكذلك نتيجة اكسدة محتويات الخلية وتتبع هذه الطريقة لتعقيم الأدوات 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:-

- 1- يجب ان تكون الادوات الزجاجية غير مبللة بالماء.
- 2 اذا كانت الزجاجيات او الادوات مغطاة بورق او مسدودة بسدادات قطنية يجب ان لا تزيد درجة الحرارة عن 160م.
- 3 يجب وضع الادوات بشكل مرتب في داخل الجهاز قبل التسخين.
- 4 وضع الادوات في داخل الجهاز بطريقة تسمح بمرور تيارات الهواء الساخنة من خلالها.
- 5- 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.

2- 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.

3- 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 .

4- 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 (100م) 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 بالحضانة او بالغرفة لمدة 24 ساعة يسمح للجراثيم المقاومة للحرارة بان تنبت وتتحول الى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم في اليوم التالي وتعقم بهذه الطريقة المواد التي تتلف او تتغير خواصها الطبيعية والكيميائية عند تسخينها الى درجة حرارة أعلى من 100م مثل بيئات الحليب والجيلاتين المغذي والبيئات المحتوية على بعض السكريات

-الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل جهاز ارنولد

1- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار.

2- يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد وصول درجة الحرارة الى 100م وليس من بدأ تشغيل الجهاز.

3- اخراج البيئات من الجهاز بعد انتهاء المدة اللازمة مباشرة.

4- يجب ان تكون المادة المعقمة مادة غذائية ا وان تكون السدادة تسمح بمرور البخار الى الداخل مثل القطن الطبي.

5- 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 121م لمدة ربع ساعة الأمر 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 الأوعية اثناء تعقيم المواد لأنه مسامي يسمح بمرور البخار من خلاله لان الحرارة الرطبة لها تأثير أكبر في قتل الاحياء المجهرية من الحرارة الجافة . تعقم معظم الأوساط الغذائية والتي لا تتلف عند تعرضها الى درجات حرارة عالية اي اعلى من 100م 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 بأحكام شديد ولذلك فان زيادة البخار في داخل الجهاز يرفع من درجة الحرارة عن 100م 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 الازمة للتعقيم
0.5 جو	113م°	30 دقيقة
1 جو	121 م°	20-15 دقيقة
1.5 جو	128 م°	5 دقائق
2 جو	134 م°	ثواني فقط

لاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الاوتوكليف

- 1- وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار المطلوب .
- 2 التأكد من ان البخار يملأ الجهاز تماما وحل محل الهواء في الجهاز.
- 3- يحسب الزمن اللازم للتعقيم بعد الوصول الى الضغط المطلوب
- 4- لا يفتح الجهاز الا بعد ان ينخفض الضغط داخل الجهاز الى الضغط الجوي العادي.

6- 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

- 1- يجب تعقيم جهاز الترشيح بجميع ملحقاته بعد لفه بورق سميك مانع للرطوبة.
- 2- يستخدم الضغط المخلخل (التفريغ عند التعقيم بهذه الطريقة للإسراع من عملية الترشيح.
- 3-يجب اختيار دقة السوائل -المرشحة ويتم ذلك بتلقيح جزء من الراشح في بيئة قياسية وتحضنيها على حرارة مناسبة . فاذا لم يظهر نمو في هذه البيئة فان ذلك يدل على دقة عملية التعقيم.
- 4- 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 الداخل 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

التعقيم الكيميائي

- تقسم المواد الكيمائية تبعا لطريقة تأثيرها على نمو البكتريا الى :
- 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 الكيمائية تبعا لمكان تأثير
- مواد كيمياوية سطحية التأثير (تستخدم للتطهير)
- مواد كيمياوية تستخدم لعلاج الامراض البكتيرية

اولا : مواد كيمائية سطحية التأثير

تستخدم في التطهير السطحي و يكون التطهير نوعان حسب الاستخدام :

للاستعمال الخارجي : (يشمل الجلد والاغشية المخاطية) تسمى بالمطهرات الخارجية Antisepticوهى تؤدى الى قتل البكتريا ولاتؤثر على الجلد والأغشية المخاطية

سطحي : يستخدم لتطهير الاسطح مثل تطهير المعامل والارضيات وادوات الجراحة تسمى المطهرات السطحية. Disinfectantsوهي تؤدى الى قتل البكتريا. وتؤثر على الجلد والأغشية المخاطية

.

امثلة على المواد الكيمياوية المستخدمة في التطهير

المادة	تاثيرها
الفينول ومركباته	يستخدم كمحلول مائي بتركيز ٢%-٥ لتعقيم الأدوات والأجهزة والأسطح. سام لترسيبه البروتينات الخلوية وإتلاف مع مجاميع الأمين الحرة لبروتينات الخلية ويكون بروتينات OHالغشاء البلازمى يعود) تأثيره الى تفاعل مجموعة غير ذائبة فتموت الخلية.
الالدهيات	اهمها الفورمالدهيد (الفورمالين) في صورة محلول مائي 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% . الميثانول سام ومهيج للعين لذا يندر استخدامه كمطهر. الكحولات مذيبة للدهون ويرسبه بالإضافة لقدرته التجفيفية.
الصابون	هو ملح صوديومي او بوتاسيومي للأحماض الدهنية يأتي تأثيره كمطر من الازالة الميكانيكية للبكتريا لانه يقلل من التوتر السطحي للماء ويذيب الدهون والشحوم باستحلابها
المنظفات	اكثر كفاءة في التنظيف والتطهير من الصابون امثلتها الصابون الانيوني والصابون الكاتيوني

مواد كيمائية مستعملة لعلاج الامراض البكترية

- تستخدم للقضاء على البكتريا مثل مركبات السلفا والمضادات الحيوية ويشترط للمواد المستخدمة في العلاج أن تكون:
- قادرة على ابادة الميكروب وعدم الاضرار بالعائل.
- يكون معدل امتصاصها بواسطة خلايا الطفيل أكبر من معدل امتصاصها بواسطة العائل.
- عالية الثبات.
- لا تتدخل ولا تؤثر على مناعة جسم العائل.

الدرس العملي الثالث عشر
الفحص الميكروبي للمياه:-

بالإضافة الى استخدام المياه العذبة النظيفة للشرب فهي ذاتها تستخدم في تصنيع كثير من الاغذية فمثل هذه الاغذية يجب ان تكون نظيفة وخالية ليس من الميكروبات المرضية فحسب بل ومن الميكروبات التي تسبب الفساد للأغذية التي يدخل الماء في تصنيعها أو 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 كالأنهار والبحيرات قبل معاملتها وتعقيمها .

بذلك اصبحت المياه في الطبيعة اكثر تلوثا من السابق مما يتطلب معاملات تعقيميه 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:-

1- 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

2- تحضير العينات

قبل البدء في اجراء الفحص على عينات المياه مباشرة ترج القنينة التي تحتوي على عينة الماء ما لا يقل عن 25 مرة ثم تجرى التخفيفات اللازمة) يعتمد ذلك على مدى تلوث الماء تحت الدراسة (10/1 و 100/1 و 1000/1 او اكثر ثم تحضر التخافيف مباشرة قبل نقل الماء للزراعة جيدا ولغاية 25 مرة.

الفحص عن بكتريا القولون Coliform

A -الفحص -الاحتمالي Presumptive test

يوضع مقدار 1 سم من كل من الماء قيد الدراسة من التخافيف المعينة في انابيب تخمر fermentation tubesتحوي سائل اللاكتوز . تحضن الانابيب على درجة حرارة 35م لمدة 24 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 24 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.

B-الفحص التأكيدي- Confirmed test

ويتم استخدام احد الاوساط الغذائية التالية -: brilliant greenlactose bile

- Eosin methylene blue(E MB)، ENDO agar، broth حيث تجرى عملية التلقيح في هذا الفحص التأكيدي على كافة الانابيب التي ظهر فيها غاز بعد 24 ساعة في الفحص الاحتمالي اعلاه
- تجرى عملية التلقيح على السطح وبطريقة التخطيط Streakعلى الاوساط المتصلبة في اطباق بتري وتحضن على درجة حرارة 35 لمدة 24 ساعة ثم تفحص الاطباق عن وجود مستعمرات القولون المثالية Typicalوبذلك يعتبر الفحص التأكيدي ايجابي واذا كانت اشكال المستعمرات غير مثالية يجرى الفحص التكميلي عليها .

C- الفحص التكميلي:- Completed test

يختار عدة مستعمرات من بكتريا القولون المثالية وعدة مستعمرات غير مثالية من على الأوساط الغذائية في الفحص التأكيدي وتنقل المستعمرات على انفراد وتزرع في انابيب تخمر تحتوي على سكر اللاكتوز وعلى انابيب اختبار تحوي على الوسط الغذائي Nutrient agarبشكل 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 negativeوان البكتريا غير سبورية وذات شكل عصوي يعتبر دليلا مقنعا للفحص التكميلي على تواجد بكتريا القولون في عينة الماء تحت الدراسة.

4- فعل البكتريا في المياه على حليب اللتموس

لقح انبوبة تحوي على حليب اللتموس بمقدار 0,1 مل من الماء قيد الدراسة ثم يحضن على درجة حرارة 200 لمدة 2-5 يوم ولاحظ تغير لون حليب اللتموس . اعمل شريحة من حليب اللتموس وافحصها مجهريا.

5- العد البكتيري للماء :-

يوضع مقدار 0,1 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 200م لمدة يومين ويحضن الطبقان الاخران على درجة حرارة 7م لمدة 10 ايام .

يلاحظ مستعمرات الميكروبات المختلفة النامية من الماء قيد الدراسة وتدرس اشكالها الظاهرية

والفحص الميكروسكوبي لها.

الدرس العملي الرابع عشر
الأوساط الغذائية

تقسم الاوساط الغذائية حسب قوامها الى قسمين رئيسيين هما :-

1 -الاوساط الغذائية السائلة : مثل المرق المغذي -Nutrient broth

2-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

وتقسم الأوساط الغذائية حسب تركيبها الى

اوساط غذائية مركبة حيث يكون تركيبها معروف كما ونوعا وتسمى . Synthetic media(مركبة)

Nano3, غم1

FeSo4 غم0.03

NaCo3 غم1

K2HPO4 غم1

1000مل ماء مقطر

اوساط غذائية معقدة تكون غير معروفة التركيب الكيميائي وتسمى 3Non - Synthetic media

Beef extraxt غم

Pepton غم5

1000مل ماء مقط

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 لكي تستعمله كمصدر 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 التغذية اذ ان وجود مستخلص اللحم يكون مصدر للكربون والطاقة اضافة الة مادة اللبيتون التي 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 لأنه مادة بروتينية معقدة ناقصة لذلك وجد بان بعض انواع البكتريا المنتجة لأنزيم الجيلاتينيز يمكن ان تحلله ويتحول الوسط الى سائل اضافة الى ان درجة انصهاره 28 اي يتحول الوسط من الصلب الى السائل في ايام الصيف الاعتيادية ومن دون وجود أي نوع من البكتريا ويجب أن يضاف بنسبة عالية جدا قد تصل الى 15% من الوسط .

اما الان فيستخدم الوسط Agar Agarالاكار اكار وهي مادة كربوهيدراتية شديدة التعقيد تستخرج من بعض اعشاب البحر ولا يمكن لأي ميكروب من تحليلها وأن درجة انصهارها 96 اي ان الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة يبقى صلب ولا يتحول الى سائل الا عند درجة حرارة اكثر من 96 وينجمد الوسط الغذائي المضاف له هذه المادة تحت درجة حرارة 42 اضافة الى انه يستعمل بنسبة اقل بكثير من استعمال الجيلاتين (1-2) وفي حالة اذا كان هناك نوع من البكتريا يمكنها ان تحلله يجب في هذه الحالة استعمال السيليكا جيل Silica gelوعموما يستخدم اكار - اكار كمادة مصلبة في الأوساط الغذائية.

اهم الفروقات بين مادتي الجيلاتين والاكار –اكار هي :

الخواص	الاكار-اكار	الجيلاتين
نسبة اضافته الى البيئة	1.5%	%15-12
تركيبه	مادة كربوهيدرايتة شديدة التعقد تستخرج من بعض الأعشاب البحرية	مادة بروتينية معقدة ناقصة
درجة انصهاره	96م	30-28م
درجة تجمده	42م	تحت 28م
مقدرة البكتريا على تحليله	جميع أنواع البكتريا لاتستطيع تحليله	تستطيع كثير من البكتريا المنتجة لانزيم الجيلاتينيز من تحليله

طريقة العمل:-

- 1- تحضير المرق المغذى Nutrient broth:-
- لتحضير 250 مل من الوسط الغذائي المرق المغذي يتم اتباع ما يلي :-
- 1- امزج 0.750غم من مستخلص اللحم و 1.250 غم من البيتون مع 250 مل من الماء المقطر في بيكر حجمه 500مل ثم تمزج جيدا لحين ذوبان المواد.
- 2- اضبط درجة حموضة الوسط (pH) باستعمال جهاز ال pH-meterباضافة حامض الهيدروكلوريك المخفف اذا ما اريد خفض ال pH او الصودا الكاوية المخففة اذا ما اريد رفع ال pHالى القيمة الملائمة لنمو البكتريا.
- 3- حضر 5 انابيب اختبار من الوسط الغذائي السابق كل منهما يحتوي على 8مل والباقي يتم وضعه في فلاسك 250 مل.
- 4- سد الانابيب والفلاسك بالقطن
- 5 عقم بجهاز الاوتوكليف تحت ضغط 15 باوند / انج وعلى درجة حرارة 121م لمدة 20
- دقيقة .

طريقة العمل :

- تحضير الاكار المغذى Nutrient agar:-
- 1- امزج 0.750غم من مستخلص اللحم و 1.250 غم من الببتون و 4.5غم من الاكار مع 250 مل من الماء المقطر في بيكر حجمه 500 مل.
- 2 -اغلي المخلوط السابق على مصباح بنزن مع الرج المستمر لكي لا تلتصق البيئة بأسفل البيكر والى ان يذوب الاكار.
- 3-اضبط pH الوسط الغذائي بنفس الطريقة السابقة.
- 4- حضر 3 انابيب اختبار كل منها يحتوي على 6مل واعملها بطريقة الاكار المائل Slantو 3 انابيب بطريقة الاكار اكار- كل منها يحتوي على 6مل ايضا و 3 بطريقة ال (Agar pourكل منها يحتوي على 13مل والباقي ضعه في فلاسك حجمه 250مل .
- 5- غط الانابيب والفلاسك بالقطن وعقم بنفس الطريقة

- تعقيم الأوساط الغذائية
- لتحضير اي وسط غذائي يجب اتباع ما يلي:
- 1 وزن كميات المواد المستخدمة بدقة.
- 2- المحافظة على الوسط الغذائي معقم لأطول فترة ممكنة لان التعقيم هو ازالة كل الاحياء المجهرية الموجودة في الوسط الغذائي.
- تعقم الأوساط الغذائية التي لا تحتوي على مواد تتلف بالحرارة باستعمال جهاز الاوتوكليف عملية التعقيم بهذا الجهاز تكون اعتياديا تحت ضغط 15 باوند انج (ضغط جوي) ودرجة حرارة 121م ولمدة 15-20 دقيقة تحسب عندما يصل الضغط الى 15 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 المفضلة حيث تستخدم بعض المرشحات مثل مرشح Millipore ذو الفتحات الدقيقة 45 ميكرون 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).

الدرس العملي الخامس عشر والأخير

مراجعة نظرية وعملية لمادة مبادى الاحياء المجهرية العملي وطرح أسئلة تفاعلية عن المادة بشكل كلي

انوي لكم الموفقية والنجاح حليفكم دوما

م.م ايناس منير العبيدي