مبادئ الاحياء المجهرية \ الجزء العملي \ المرحلة الثانية

م. نوال خالد زبين

المحاضرة الأولى

أهم الأجهزة والادوات في مختبر المايكروبايولوجي

1- الاوتوكليف : Autoclave

يستخدم لغرض التعقيم ، حيث تستخدم فيه الحرارة مع البخار مما يتولد عن ذلك من ضغط ، ويدخل الضغط والحرارة في تعقيم الاوساط الغذائية والمحاليل . ان درجة الحرارة المستخدمة في المختبر غالباً

تكون 121مْ وبضغاضنة 15 باوند / انج ^{2} ولمدة 15 دقيقة .

2- جهاز التعقيم بالهواء الساخن :Oven

يستخدم هذا الجهاز بتقيم الادوات الزجاجية والمواد المعدنية واطباق بتري بدرجة حرارة 180 - 200 مْ لمدة 2-3 ساعات .

3- الحاضنة : Incubator

وهو جهاز يستخدم لحضن مزارع المتطلبات الكائن الحي المجهري احياء المجهرية بدرجات حرارة مناسبة حسب متطلبات الكائن الحي المجهري ، توضع الأطباق في الحاضنة بصورة مقلوبة وذلك لمنع تلوث هذه الأحياء وتكاثف وتساقط قطرات الماء على المزرعة مما يودي الى تلوثها وصعوبة الحصول على مزرعة نقية ومستعمرات منفردة .هناك نوع من الحاضنات يسمى Incubator cold ذلك لكون هذه الحاضنات تحتوي على درجات حرارة أقل من الصفر -50مْ تقريباً.

4- الحاضنة الهزازة: وهو جهاز يستخدم لحضن المزارع المايكروبية في الاوساط السائلة لتوفير ظروف المناسبة لنمو البكتريا وغيرها من الاحياء المجهرية التي يزداد نموها بتوفيرالحركة والتهوية والحرارة المناسبة للنمو .

5-الميزان :Balance

يستخدم لوزن المواد الداخلة في تركيب الاوساط الزرعية أو الغذائية لغرض تحضيرها للزرع.

6-جهاز التقطير :

يستخدم لتقطير الماء الداخل في تحضير الاوساط الزرعية والمحاليل الكيميائية المختلفة .

7- الثلاجة:

تستخدم لحفظ المزارع المايكروبية بدرجة حرارة وح بيبن 4-5 مْ .

8- الحمام المائي : Water bath

يستخدم الحمام المائي لتنمية بعض الاحياء المجهرية التي يتطلب نموها في جو رطب ، كذلك يستخدم لاذابة الزرعية الصلبة قبل او بعد تعقيمها كما يستخدم في عمليات البسترة .

9- الخلاط : Blender

يستخدم لتجنيس المادة الغذائية المراد فحصها مختبريا ز

10- جهاز عد المستعمرات :Colony counter

يستخدم لعد المستعمرات المايكروبية النامية في اطباق بتري .

11- loop:

عبارة عن انبوب معدني او زجاجي في نهايته سلك رفيع ينتهي بحلقة ، يستخدم اثناء الزرع لنقل الاحياء المجهرية من وسط سائل الى وسط سائل اخر ، او من وسط صلب الى وسط صلب اخر أو بالعكس .

خطوات الوخز العميق لاختبار الحركة تعكير البيئة حول خط

12- الابرة : Needle

عبارة عن سلك رفيع لا ينتهي بحلقة عمله مشابه لعمل اللوب .

13- الناشر : L- shape

هو عبارة عن ساق زجاجية على شكل **حرف L** يستخدم لنشرالاحياء المجهرية على الوسط الغذائي الصلب فقط .

14- كابينة الزرع : HOOD

15- حامل الاطباق الزجاجية

16- انابيب اختبار

17- الماصات الزجاجية

18- الملقط

19- مصباح اللهب: BURNER

20- SPATULA

21- المجهر : Microscope

هو عبارة عن جهاز ضوئي يستخدم لتكبير الاجسام التي لا ترى بالعين المجردة ومن اهم اجزاءه

أ- القسم الالي ويشمل

1- القاعدة المعدنية : والتي تؤمن استقرار وثبوت المجهر افقياً

2- العمود الاسطواني : وظيفته حمل العدسات العينة

3- منضدة المجهر : التي تحمل الشرائح الزجاجية وتثبت بواسطة مثبت متحرك

4- الذراع المعدني : الذي يتصل افقياً مع العمود الاسطواني وسفلياً مع القاعدة المعدنية

ب- القسم الضوئي ويشمل

1- العدسة العينية : وهي التي تكون بمقربة من عيني الفاحص وتقوم بتكبير الصورة بعدة قوى تكبيرية منها 6 أضعاف أو 10 أضعاف أو 15 ضعف .

2- العدسة الشيئية :

التي تكون بمقربة من الجسم المفحوص وتقسم الى ثلاث اقسام

أ – العدسة الشيئية الصغرى : تعمل بقوة تكبير 10 مرة

ب- العدسة الشيئية الكبرى : تعمل بقوى تكبير 40- 60 مرة

ج- العدسة الزيتية : تعمل بقوة تكبير 100 مرة

المكثف :

يتكون من مجموعة عدسات تكثف الاشعة الضوئية وهو مزود بلوب جانبي لتحريك المكثف للاعلى والاسفل لتقوية الرؤيا او اضعافها حسب متطلبات الشريحة المراد فحصها

المنظم أو الضابط الكبير :

وهو مفتاح ينزل المنضدة التي تحوي العينة للحصول على صورة اوضح

المنظم أو الضابط الصغير :

ويستخدم للحصول على صورة اوضح للعين المجردة

القاعدة :

تحتوي على مصدر للاضاءة

من اهم انواع المجاهر (المجهر البسيط العادي ، المجهر الضوئي ، المجهر الالكتروني)

تنظيف المجهر :

1- ينظف بواسطة قطعة قماش ناعمة بدون زايلين ما لم يلمسها العدسة الزيتية

2- العدسة الزيتية بعد كل استخدام تمسح بالزايلين ولا يستخدم الكحول مطلقا لتنظيفها

3- بعد تنظيف جميع اجزاء المجهر بقطعة قماش ناعمة يغطى بغطاء خاص به

علل : لماذا تستخدم قطرة من زيت اشجار الارز بتماس مباشر مع العدسة الزيتية

ج- وذلك لتوضيح الرؤية فاذا لم يكن هناك تماس بين قطرة الزيت والعدسة سوف تنكسرالاشعة الضوئية خلال الزيت وبالتالي تكون الرؤيا غير واضحة .

المحاضرة الثانية

الاوساط الزرعية (الغذائية) :culture media

وهي تلك البيئة التي تستعمل لتنمية الأحياء المجهرية المختلفة في المختبر وهي تحتوي على جميع المكونات الضرورية لنمو الكائن الحي المجهري ، وعند تحضير الوسط الغذائي يجب تهيئة كل العوامل الضروالاحرية للنمو كتوفير(الرطوبة ، الضغط الاوزموزي ، رقم الحموضة ، الشد السطحي ، الاكسدة والاختزال ، والتأكد من خلوه من المواد المانعة لنمو الاحياء المجهرية).

ومهما اختلفت هذه الاوساط بالتركيب فلا بد من احتوائها على مصادر غذائية رئيسية مثل الكاربون والنيتروجين والمعادن وعوامل النمو كالفيتامينات و العوامل المساعدة الاخرى .

تقسم الاوساط من حيث محتواها الى :

1- الأوساط الطبيعية : Natural culture

وهي تلك الاوساط التي تكون مجهولة التركيب والتركيز مثل (فضلات الخبز ، فضلات الفاكهة ، البطاطا ، الدم)

2- الاوساط الصناعية أو الكيميائية : Synthetic or Chemical media

وهي تلك الاوساط التي تكون مكوناتها التركيب والتركيز مثل MacConkey agar و Lactose broth

وتعد هذه الاوساط بيئات غنية وجيدة لزراعة مدى واسع من الاحياء المجهرية الاخرى ،وهي تكون اما بحالة صلبة او شبه صلبة او سائلة . وان مكوناتها اغلبها مواد عضوية أولية مختلفة ويكون مصدرها اما حيواني او نباتي أو من الأحياء المجهرية أو مواد كيميائية ، ومن المواد التي تدخل في تصنيع هذه الاوساط :

مستخلص لحم البقر : Beef extract ، مستخلص الخميرة : Yeast extract ، البيتون : Peptone

3- الأوساط شبه الصلبة : Semi- synthetic media

وهي تلك الاوساط التي تكون بعض مكوناتها معلومة التركيب والتركيز وبعضها الاخر مجهولة التركيب والتركيز ومثال عليها Potato dextrose agar

تقسم الاوساط حسب وظيفتها اوعملها الى :

1- الاوساط الانتقائية : Selective media

وهي تلك الاوساط التي تسمح بنمو انواع من الاحياء المجهرية ولا تسمح بنمو انواع اخرى و ذلك نتيجة لاضافة بعض المواد للوسط الغذائي مثل الأصباغ ومن الامثلة عليها وسط (MacConkey agar) الذي يسمح بنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام ولا يسمح بنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام .

2- الاوساط التفريقية : Differential media

وهي الاوساط التي يمكن من خلالها تمييز الأنواع البكتيرية النامية على الطبق نفسه مثل Blood agar base

اذ يضاف الى هذا الوسط 5-7 % دم بشري أو حيواني وبهذا الوسط نستطيع التمييز بين البكتريا المحللة للدم Hemolytic وغير المحللة ، اذ ان البكتريا التي لها قدرة على تحليل كريات الدم تكون مناطق رائقة حول مستعمراتها ، في حين نجد البكتريا غير المحللة لا تكون مثل هذه المناطق الرائقة .

3- اوساط العد : Numeration media

وهي الاوساط التي تحتوي على كافة المتطلبات الغذائية الضرورية لنمو اكبر عدد من الأنواع البكتيرية أو الاحياء المجهرية الاخرى لغرض عدها ومثال عليه وسط Nutrient agar .

4- اوساط الاغناء : Enrichment media

هي تلك الاوساط التي تسمح للبكتريا بالنمو بعد اضافة بعض العناصر التي لا تستطيع البكتريا تصنيعها اذ هناك بعض البكتريا لا يمكنها القيام بانتاج الفيتامينات والمركبات الضرورية االأخرى ، وبنفس الوقت لا تستطيع الاستغناء عنها لتنمو لذا يجب اضافتها للاوساط لاحتوائها ضرورية لنمو الاحياء المجهرية .

5- اوساط الحفظ والادامة : Maintenance media

وهي الاوساط التي تسمح للبكتريا بالنمو بصورة بطيئة وذلك لتتمكن من حفظها لاطول مدة ممكنة .

6- اوساط التشخيص : Characterization media

تستخدم هذه الاوساط للكشف عن خواص معينة في البكتريا وتحديد نوع الناتج كان يكون غاز او تغييرلون البيئة وغيرها .

7- اوساط العزل : Isolation media

وهي اوساط زرعية تحتوي على جميع المكونات الضرورية لنمو الاحياء المجهرية .

تقسم الاوساط حسب القوام :

1- الاوساط السائلة : Liquid

وهي تلك الأوساط الناتجة من اذابة مكونات الغذاء في الماء المقطر وتعبأ هذه الاوساط في انابيب الأختبار والدوارق الزجاجية .

2- الاوساط الصلبة : Solid

وهي نفسها الاوساط السائلة لكن يضاف لها بعض اا لمواد المصلبة كالجيلاتين والاكار المستخرج من الطحالب الحمراء الموجودة في اعماق البحار وخاصة التابع لجنس Geledium واهمية الاوساط الصلبة للحصول على نمو سطحي للبكتريا ولمشاهدة اشكال وصفات المستعمرات والحصول على مستعمرات مفردة ونقية .

من اهم فوائد الاكار هو امتلاكه عدة مميزات منها :

1- يذوب الاكار بدرجة حرارة أعلى من 96 مْ ولا يتصلب الا بدرجة حرارة اقل من 42-45 مْ

2- يضاف الاكار بنسبة 15 % للوسط لغرض تصلبه وبنسبة 1-2 % لكي يكون شبه صلب

3- يستخدم الوسط الصلب في عزل المستعمرات البكتيرية

يمكن اذابة الاكار بوضعه في ماء مغلي لكي يذوب ولكي يتصلب يوضع في ماء بارد

طريقة تحضير الاوساط الغذائية

1- توزن مكونات الوسط بدقة وتذاب في حجم معين من الماء المقطر الموجود في دورق مخروطي conical flask

2- يوضع الدورق في حمام مائي بدرجة حرارة 96 مْ لاذابة الاكار والحصول على خليط متجانس

3- يعدل pH باستخدام جهاز PH meter حيث لكل وسط pH خاص به واغلب البكتريا يكون ال pH متعادل 7 وفي حالة الخمائر والاعفان فيكون ال pH الحامضي 3.5 – 4.5

4- يعقم الوسط الغذائي بالاوتوكليف

5- بعد انتهاء عملية التعقيم التي تستغرق 15-20 دقيقة يبرد الوسط الزرعي وذلك بوضعه في حمام مائي بدرجة حرارة 45م˚ فما فوق وذلك لمنع تصلبه

6- يصب هذا الوسط في اطباق بتري ويترك ليتصلب او يحفظ بالثلاجة لحين استخدامه

المحاضرة الثالثة

تصبيغ البكتريا Staining of bacteria

انواع الصبغات

1- الصبغات الحامضية :Acidic dyes

وهي صبغات تحمل شحنة سالبة (-) مثل صبغة السفرانين Safranin الحمراء وصبغة carbol fuchsine و Acid fuchsine و وصبغة Congo red وهو شاي صيني اسود

Fuchsine: وهي صبغة حمراء مزرقة مشتقة من شجيرة ذات زهرات حمراء او ارجوانية

2- الصبغات القاعدية : Basic dyes

وهي الصبغات التي تحمل الشحنات الموجبة (+) مثل صبغة كرستال فايوليت Crystal violet ولونها بنفسجي و صبغة Methyl violet

3- الصبغات المتعادلة : Neutral dyes

وهي الصبغات التي تحمل شحنات موجبة وسالبة مثل صبغة Methylene b blue

لماذا تصبغ الخلايا البكتيرية ؟

البكتريا عبارة عن خلايا شفافة لا يمكن رؤيتها بالمجهر الا بعد تصبيغها

التصبيغ يفيدنا في :

1- رؤية الخلايا الشفافة بوضوح

2- معرفة شكل وحجم الخلايا البكتيرية

3- للكشف عن بعض التفاعلات الفيزيائية والكيميائية التي تحدثها الصبغات مع الخلية البكتيرية لتساعد في تشخيص البكتريا

تحضير وتثبيت الغشاء البكتيري للصبغ(اللطخة SMEAR)

Preparation and Fixation of Bacteria for Staining

تحضير اللطخة للمزارع الميكروبية السائلة :

يعقم اللوب بالحرارة ثم نبرده وبعد ذلك يغطس بالمزرعة السائلة نرفعه بعد ذلك ونضع القطرة المحمولة بطرف اللوب على سطح الشريحة الزجاجية بالمنتصف بعدها نوزع القطرة بالتساوي ضمن مساحة محددة من منتصف الشريحة الزجاجية لغرض تجنيس وتوزيع القطرة بصورة متفرقة بعدها تجفف اللطخة بالهواء الاعتيادي وتثبت بامرارها على اللهب عدة مرات ، ولا يجوز امرار اللطخة مباشرة على اللهب دون ان تجف وذلك خوفاً من حصول تشوه للخلايا ولا تعطي اشكالا حقيقية .

تثبت اللطخة على حرارة اللهب وهي تساعد على تخثر البرتين الخلوي مما يساعد على التصاق خلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية

نعقم اللوب على اللهب ونأخذ بوا سطتة قطرة من الماء ونضعها بمنتصف الشريحة الزجاجية وبعدها نعقم اللوب مرة ثانية ونبرده نأخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط صلب ونضعه على القطرة ونمزجه جيداً معها ونبدا بتوزيع المزيج على الشريحة وبعدها نكمل العمل كما ذكر سابقاً

طرق تصبيغ : Methods staining

التصبيغ البسيط : simple staining

تأخذ اللطخة المحضرة سابقاً ونضع عليها عدة قطرات من صبغة methylene blue لمدة 1-2 دقيقة بعدها نغسل الشريحة الزجاجية بالماء . نجفف اشريحة بالهواء ونفحصها تحت المجهر ونلاحظ البكتريا قد تلونت بلون ازرق .

الصبغ المركبcompound staining (تصبيغ gram)

تستخدم فية اكثرمن صبغة واحدة ويعرف ايضا بالصبغ التفريقي differential staining لانة يتم فية التفرقة بين البكتريا في مجاميع مختلفة تبعا لقابليتها وتفاعلها مع الاصباغ المستخدمة في الصبغ. ومن اهم طرق الصبغ المركب صبغ جرام .

عند اتباع هذة الطريقة نجد ان البكتريا تنقسم الى مجموعتين

1-بكتريا تصبغ بالصبغة القاعدية الاساسية(الكريستال البفسجي) في وجود اليود بدرجة لايمكن معها ازالة الصبغة من الخلايا بالغسيل بالكحول او الاسيتون .

gram positive وتصبغ خلايا البكتريا باللون البفسجي وتعرف بالبكتريا الموجبة لجرام

2- بكتريا تزال منها الصبغة البنفسجية بعد الغسل بالكحول بسهولة لذلك (لذلك تصبح الخلايا شفافة بعد الغسل بالكحول)

ولتسهيل رؤية خلاياها تصبغ بصبغ احمر مثل (السفرانين)وتسمى بالصبغة العكسية .

حيث تصبغ خلايا البكتريا باللون الاحمر وتسمى البكتريا السالبة لجرامgram negative .

وتفسير هذا الاختلاف يرجع الى اسس كيمائية اذ ان سطح خلايا البكتريا الموجبة لجرام يحتوي على كميات من ملح المغنيسيوم لحمض الريبونيوكليك والتي تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوي وصبغة الكريستال البفسجية واليود.وهذاالمركب المعقد يثبت الصبغة في الخلية ويجلعها اكثر مقاومة للازالة عند الغسيل بالكحول.اما البكتريا السالبة لجرام فسطح خلاياها لايحوي على حمض الريبو نيوكليك والمغنسيوم لذلك فأن صبغة الكريستال البنفسجي لاتثبت في الخلايا وتزال عندالغسيل بالكحول.

خطوات العمل :

1-يحضر غشاء بكتيري من مزرعة بكتريا النامية على الاجار,ثم يثبت بتمريرة في اللهب عدة مرات.

2-تترك الشريحة لتبرد ثم يغمر الغشاء بضبغة الكريستال البنفسجي لمدة دقيقة.

3-تغسل الشريحة بالماء الجاري.

4-يغمر الغشاء باليود لمدة دقيقة

5-تغسل الشريحة بالماء ثم تترك لتجف بالهواء.

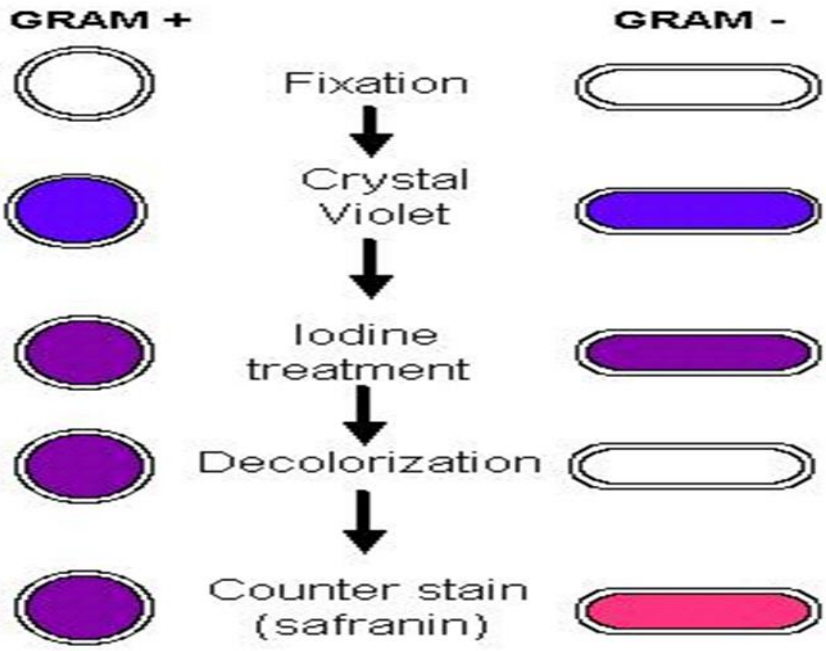
6-يغسل الغشاء بالكحول الايثايل باضافتة للشريحة نقطة نقطة مع امالة الشريحة ليتساقط منها الكحول حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون

7-يغسل الغشاء بالماء.

8-يغمر الغشاء بصبغ السفرانين لمدة نصف دقيقة.

9-يغسل الغشاء بالماء.

10-تجفف الشريحة ثم تفحص بالمجهر.



علل : يجب ان يكون الكحول المستخدم لغرض التعقيم بالمختبر تركيزه 70% لا أكثر ولا أقل من هذه النسبة.

ج: تركيز 70% يدنتر أو يتلف المادة البروتينية في الخلية ، بينما اذا كان تركيز الكحول أكبر من 70% فأنه سيحصل فقد في ماء الخلية فقط ، أما اذا كان التركيز أقل من 70% فأن ذلك لن يؤثرلا على البروتين ولا على البروتين ولا الماء في الخلية البكتيرية

علل : اضافة اليود بعد الصبغة الأساسية كرستال فايوليت في التصبيغ التفريقي

وذلك لتكوين معقد الصبغة واليود CV-I وكذلك يفيد اليود في تثبيت الصبغة ويقلل من قابيلة ذوبانها

علل : تظهر البكتريا المصبغة بطريقة كرام بمجموعتين ، مجموعة سالبة حمراء اللون ومجموعة بنفسجية اللون موجبة

ج- السبب في ذلك يعتمد بالدرجة الاساس على الاختلاف الكيميائي لجدار الخلية البكتيرية واذ يتمييز جدار ا لبكتريا السالبة لصبغة كرام باحتوائها على نسبة دهون 11-22% بينما جدار الخلية الموجبة يحتوي على 4% فقط

ميكانيكية العمل :

في البداية تضاف صبغة الكرستال فايوليت وبعد اضافة اليود يتكون معقد CV-I وبعد اضافة الاسيتون أو الكحول فانه سيذيب الدهون الموجودة في جدار الخلية ، اما البكتريا السالبة بما ان الدهون الموجودة في جدارها الخلوي عالية فانها ستذوب وتتكون فتحات أو ثغور كبيرة في هذا الجدار مما يؤدي الى خروج المعقد أي الصبغة الاساسية وتصبح هذه الخلية جاهزة لاستقبال الصبغة الثانية السفرانين مما يؤدي الى تلونها باللون الأحمر .اما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فان نسبة الدهون قليلة بجدارها الخلوي فأن اضافة الكحول في هذه الحالة سيؤدي الى انكماش فتحات الجدار بسبب ازالته للماء الموجود بجدار الخلية وتسمى هذه العملية Dehydration ازالة الماء مما يمنع خروج المعقد الى الخارج وبالتالي تحتفظ الخلية بلونها الاساسي

(البنفسجي) لان الصبغة الثانية السفرانين لا تستطيع اختراق جدار الخلية لانكماش الثغور فيه اذن اضافة الكحول للبكتريا الموجبة لصبغة كرام تؤدي الى ازالة الماء وبالتالي تقلل من عملية النفاذية .

المحاضرة الرابعة

تصبيغ أجزاء الخلية البكتيرية

1- تصبيغ السبورات : Spores staining

بعض البكتريا لها القابلية على انتاج جسم بيضوي ذي جدار سميك ويكون مقاوم للعوامل الخارجية المحيطة به بدرجة عالية ويعرف هذا الجسم بالسبور والذي يمثل الطور الساكن والخلية البكتيرية لها القابلية على انتاج سبور واحد وتتصف أنواع جنسي *Clostridium* و *Bacillus* بقابليتها على انتاج

تقاوم السبورات التصبيغ العادي لان جدارها يكون سميكاً لذا يجب استخدام صبغات لتسهيل ادخال الصبغة اليها ، وبمجرد دخول الصبغة الى السبورات فانها تثبت بها ويصعب ازالتها منها ، تبقى السبورات لفترات طويلة في طور سكون وعود العديد منها الى النمو يتوفر الظروف الملائمة لتكوين الخلية البكتيرية .

طريقة شيفر وفولتون لتصبيغ السبورات: Schaeffer and Fulton

1- تحضر اللطخة المثبتة بالنار

2- نضع محلول صبغة ملكايت كرين malachite green على اللطخة ثم نسخن الشريحة الى ان يبدأ المحلول بالتبخر (لا ندع الشريحة تجف حيث نضيف المحلول ونحسب الوقت لمدة 3-4 دقائق .

3- نغسل الشريحة بالماء ثم نضيف صبغة السفرانين لمدة 1-2 دقيقة

4- نجفف الشريحة الزجاجية لمدة 1-2 دقيقة ونضعها تحت المجهر فنلاحظ ان البكتريا تصبغت باللون الاحمروالسبورات باللون الاخضر .

تصبيغ الكبسولات : Capsules staining

الكبسولة (العلبة) هي طبقة سميكة صمغية لزجة تتكون من مادة كربوهيدراتية معقدة وحامض اليورانيك البعض ومن انواع البكتريا المكونة للكبسول هي :

pneumoniae , Streptococcus pneumoniae, Bacillus, Klebsilla

بسبب الطبيعة غير الأيونية للعلبة فأن الصبغات البسيطة لا تلتصق بها ولذا يفضل صبغات خاصة ،عدم استخدام الماء عند التصبيغ لان مادة الكربوهيدراتية تذوب بالماء وان الصبغة المستخدمة هي الحبر الهندي Nigrosine والحبر الصيني .

طريقة تصبيغ الكبسول :

نحضر اللطخة المثبتة بالنار ونضع عليها عدة قطرات من صبغة كريستال فايوليت لمدة 5 دقائق ، بعدها نضيف محلول كبريتات النحاس بتركيز 20% وتجفف الشريحة وتفحص تحت المجهر حيث يظهر الكبسول مصبغ بالازرق الفاتح بينما تصبغ محتويات الخلية بالازراق الغامق .

تصبيغ الاسواط : Flagella staining

الاسواط عبارة عن زوائد أو بروزات شبه شعرية تخترق جدار الخلية البكتيرية الى الخارج من قاعدة منطقة حبيبية في السايتوبلازم . ويتركب السوط من مادة بروتينية تسمى **Flagellin** تتكون من سلاسل بروتينية

ان تقنية تصبيغ الاسواط صعبة نوعاً ما لذا يجب اتخاذ الحذر اثناء عملية التحضيروالتصبيغ والصبغة المستخدمة هي carbolfuchsine .

التصبيغ السلبي : Negative saining

وهي التقنية التي تظهر فيها الخلايا البكتيرية لامعة من غير تصبيغ اذ تصبغ خلفية المسحة فقط وتظهر الكائنات واضحة لامعة في حقل مجهري غامق والصبغة المستخدمة هي النكروسين وتستخدم هذه التقنية بصورة خاصة للبكتريا المكونة للكبسول اذ تظهر الكبسولات على شكل مناطق فاتحة وصافية .

تصبيغ البكتريا المقاومة للاحماض : Acid fast staining

تحتوي بعض البكتريا مثل mycobacteria على نسبة عالية من الدهن تجعلها تقاوم التصبيغ بالطرق الاعتيادية ولكن يمكن تصبيغها باستخدام صبغات خاصة مع الحرارة وبعد اخذ البكتريا للصبغة سوف يصعب ازالتها منها حتى باستعمال اقوى الكحولات الحامضية لذا تسمى هذه البكتريا بالبكتريا المقاومة للاحماض .

طريقة التصبيغ :

1- نحضر اللطخة المثبتة بالنار

2- نضيف عدة قطرات من صبغة carbolfuchsin ونسخنها على اللهب لمدة 3-4 دقائق الى ان يتبخر

3- نضيف كحول مع حامض لمدة نص دقيقة

4- نغسل الشريحة بالماء ونضيف صبغة methylene blue

5- نغسل الشريحة ونجففها ونفحصها بالمجهر فتبدو البكتريا والمقاومة للاحماض مصبغة باللون الاحمر ، في حين البكتريا غير المقاومة للاحماض مصبغة باللون الازرق .

ومن الامثلة على البكتريا المقاومة للاحماض ***Mycobacterium tuberculosis***

المحاضرة الخامسة

فحص حركة البكتيريا بواسطة القطرة المعلقة

Examination of Bacterial Motility using Hanging Drop Technique

(nonmotile) وغير متحركة (motile) تقسم البكتيريا من حيث قدرتها على الحركة إلى بكتيريا متحركة فإن هذه الأنواع البكتيرية (flagella) ونظرا لوجود أعضاء حركية للبكتيريا المتحركة والتي تسمى الأسواط أو تسمى حركة حقيقية، ويمكن دراسة هذه الأعضاء (vital movement) تكون متحركة حركة حيوية والحركة الحيوية للبكتيريا (Hanging Drop Preparation) الحركية بواسطة تحضير القطرة المعلقة فهي حركة تذبذبية غير (Browanian movement) حركة تقدمية منتظمة. أما الحركة البراونية للبكتيريا .منتظمة للأمام والخلف تحدث لأي جسم سواء كان حيا أو ميتا

ملاحظة: يجب استخدام مزارع بكتيرية حديثة الزرع، لا يتجاوز عمرها 18 ساعة لأن البكتيريا تفقد * قدرتها على الحركة بتقدم العمر.

طريقة العمل :

1- ينقل بابرة التلقيح ذات العقدة نقطة صغيرة من المزرعة البكتيرية حديثة العمر نشطة النمو الى مركز غطاء شريحة نظيف

2- يوضع في اركان الغطاء نقط صغيرة من الفازلين

3- توضع الشريحة المقعرة فوق الغطاء ثم تقلب الشريحة باحتراس بحيث تكون النقطة المعلقة في منتصف التقعير بدون ملامسة قاع الشريحة

4- توضع الشريحة على المجهر ويتم الفحص عند حافة القطرة مع مراعاة تقليل الاضاءة

5- يتم الفحص باستخدام العدسة الزيتية

6- يوصف مع الرسم حركة وشكل وطريقة تجمع الخلايا مع بيان نوع الحركة

عزل وتنمية الأحياء المجهرية

تنتشر الأحياء المجهرية في طبيعة بالاصورة واسعة جداً وتوجد في اماكن مختلفة منها ، مثلاً بالماء والهواء وعلى سطوح الاشجار وفي النباتات واجسام الحيوانات وجسم الانسان وفي الينابيع الحارة وفي المناجم على الرغم من تواجد الابخرة والغازات السامة الا انها تستطيع النمو في هذه البيئات .

كيف يمكن عزل الاحياء **من تلك المصادر ؟**

يمكن عزل الاحياء المجهرية الموجودة بالهواء وذلك بتحضير طبق يحتوي على وسط غذائي مناسب ونفتح الطبق في احد جوانب المختبر ونتركه لمدة 5- 10 دقائق ، بعد ذلك نغلق الطبق ويوضع بالحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة . بعدها نلاحظ نمو المستعمرات البكتيرية والاحياء المجهرية .

بينما يمكن ان نعزل من مناطق اخرى مختلفة مثلاً (جسم الانسان ، الشعر ، البلعوم ، الفم ، الاسنان ، الصدرية ..... الخ) نستخدم وسط غذائي معقم ونستعين ب swab وهي عبارة عن قضيب خشبي يحمل في نهايتيه قطعة من القطن ، نضع السواب على الجزء المراد عزل المراد عزل الاحياء المجهرية منه ويخطط على الوسط ونوزعه ، ثم نضع الطبق بالحاضنة بصورة مقلوبة لمدة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ.

طرق عزل وتنقية الاحياء المجهرية :

توجد الاحياء المجهرية في الطبيعة بصورة مختلفة فعند عزل هذه الاحياء من الهواء نحصل على انواع واجناس مختلفة منها ويطلق على هذا النوع من المزارع بالمزارع المختلطة mixed culture وهي المزارع الحاوية على انواع مختلفة من الاحياء المجهرية ، وللحصول على مزرعة نقية pure culture (وهي المزرعة الحاوية على نوع واحد فقط من الاحياء المجهرية) .

طرق الزرع والعزل البكتيري :

1- تخطيط الأطباقStreak plating

عندما نضع المزارع البكتيرية علي سطح الأجار بواسطة أبرة التزريع ذات العقدة Loop أو منحنية الطرف فإن هذا يسمي تخطيطاً.

يمكن عمل الأطباق المخطوطة بأكثر من طريقة لتعطي نتائج ممتازة إذا أجريت بدقة،وإن الهدف من الأطباق المخطوطة هو الحصول علي معلق البكتريا المركز علي مستعمرات منفصلة تماما وعند التلقيح فإن الخلايا الكثيرة المتزاحمة الموجودة في بداية التخطيط تكون مستعمرات قريبة جدا من بعضها ولكن باستمرار التخطيط فإن أعدادهاً تصبح أقل فأقل .

طريقة التخطيط الأولي:

1- عقم اللوب في اللهب حتى الاحمرار ثم أتركها لتبرد 20-30 ثانية.

2- أغمس اللوب في المزرعة السائلة المراد زرعها واقل المستعمرة الى طبق آخر.الخاص بالزرع والمحتوي على الوسط الزرعي الصلب .

3- أبدأ بالتخطيط بادئا من الجهة البعيدة عنك في الطبق ثم سر باللوب في أتجاهك ملامسا سطح الأجار ذهابا وإيابا من حافة الي حافة مكونا خطوطا متوازية تبعد عن بعضها حوالي نصف سنتيمتر.

4- عندما تصل الي منتصف الطبق لف الطبق 180 درجة واستمر في التخطيط متجها الي الجهة البعيدة

عنك هذا التغير في الاتجاه لتجنب تعارض اللوب مع حافة الطبق.

5- غط الطبق بغطائه الممسوك بيدك الأخرى.

6- حضن الطبق في درجة الحرارة المطلوبة لمدة 24 ساعة.

طريقة التخطيط الثاني:

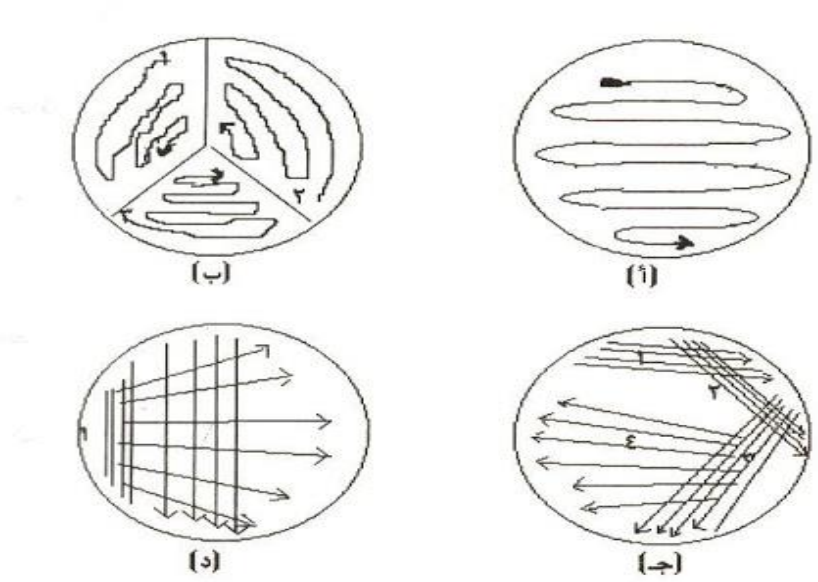
1- عقم اللوب في اللهب حتى الاحمرار ثم أتركه ليبرد 20-30 ثانية ومن ثم اعمل خطين أو ثلاثة أو أربعه خطوط متوازية.

2- عقم مرة أخري باللهب ثم أعمل خطوط عمودية علي الخطوط الأولي.

3- عقم وكرر العملية وبهذا أنك تحقق نفس النتيجة الطريقة الأولي وهي تخفيف المزرعة.

4- غط الطبق بغطائه الممسوك بيدك الأخرى.

5- حضن الطبق في درجة الحرارة المطلوبة لمدة 24 ساعة .



الطرق المتبعة فى تخطيط سطح الآجار .

يجب تحضين الأطباق وهي مقلوبة والغرض من ذلك تجنب تكاثف الماء علي الغطاء من الداخل ثم سقوطه علي المجاميع البكتيرية النامية فيسبب انتشارها وتداخلها مما يصعب عملية الفصل في أشكال المستعمرات.

2- طريقة النشر Spread method

يستخدم في هذه الطريقة الاوساط الصلبة اذ يحضر الوسط الغذائي الصلب ويعقم بعدها يصب في اطباق بتري وبعد ان تتصلب ثم ياخذ اما بواسطة الماصة المعقمة او المايكروبايبيت 0.1 مل من المزرعة السائلة الحاوية على معلقات بكتيرية (كالحليب السائل ومياه المستنقعات او ماء الحنفية ..... الخ) في وسط طبق بتري وبواسطة الناشر الزجاجي نبدأ بنشر المعلق البكتيري في جميع اتجاهات الطبق بعدها يوضع الطبق بالحاضنة بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة بعدها يلاحظ نمو المستعمرات المختلفة بالاشكال والالوان الخاصة وبالتالي ممكن عدها وتشخيصها .

3- طريقة الزرع على السطح المائل : Slant method

Slant : عبارة عن انبوبة اختبار تحتوي على وسط غذائي متصلب بصورة مائلة وتستعمل هذه الطريقة لعزل وحفظ المزارع البكتيرية ، وان تصلب الوسط الغذائي بصورة مائلة بالانبوبة يعطي مساحة اكبر لنمو البكتريا عليه ويسهل تلقيح الوسط بالاحياء المجهرية . ويتم تحضير السلانت بتهيئة وسط غذائي مناسب وصبه في انبوبة اختبار ثم نضع الانبوبة بصورة مائلة الى ان يتصلب الوسط بعدها يعقم اللوب بالحرارة ويوخذ بواسطته قطرة من المحلول المحتوي على البكتريا المراد فحصها وتنشر القطرة بشكل حلزوني على سطح الوسط المائل باستخدام اللوب وتحضن الانبوبة بدرجة 37مْ لمدة 24-48 ساعة ويلاحظ النمو عليها

4-طريقة الصب Pour method

تستعمل هذه الطريقة للحصول على مزرعة نقية من مزرعة نامية عليها انواع مختلفة من الاحياء المجهرية وتختلف هذه الطريقة بنقل الاحياء المجهرية الى الوسط الغذائي وهو بحالته السائلة قبل ان يتصلب وكما بالخطوات التالية :

1- يحضر الوسط الغذائي ويعقم بهدها يوزع الوسط في انابيب اختبار بعد ترقيمها كل انبوبة تحتوي على 12-15 مل من الوسط الغذائي

2- يعقم اللوب وننقل بواسطته قطرتين من محلول يحتوي على البكتريا المراد فحصها الى انبوبة الختبار رقم (1) .

3- نعقم اللوب مرة ثانية . وننقل بواسته قطرتين من الانبوبة رقم (1) الى الانبوبة رقم (2) ونرجها

4- نكرر العملية بنقل قطرتين من الانبوبة رقم (2) الانبوبة رقم (3)

5- تترك الانبوبة رقم (4) بدون تلقيح ونستعملها للمقارنة control

6- نسكب محتويات كل انبوبة اختيار في طبق بتري معقم ونتركها حتى تتصلب الوسط الغذائي وهو في انبوبة الاختبار يجب اجراء خطوات العمل اعلاه بصورة سريعة كما يمكن سكب الوسط الغذائي في الطبق مباشرة بعد نقل القطرات في كل خطوة .

7- نحضن الاطباق على حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة وبعدها نلاحظ النمو

ملاحظة : اثناء عملية التخطيط على الوسط الصلب سواء في الطبق أو على السلانت يجب مراعاة عدم **تخديش سطح الوسط الغذائي .**

المحاضرة السادسة

فحص الخمائر والاعفان

الخمائر Yeast

وهي كائنات حقيقية النواة ، حجمها اكبر من البكتريا بحدود 30- 100 ميكرون ، موجبة لصبغة كرام ، تتكاثر الخمائر لا جنسياً عن طريق التبرعم Budding و جنسياً بواسطة السبورات الكيسية Ascospore

ولفحص الخمائر مجهرياً نقوم بما يلي :

1- نأخذ باللوب المعقم محلولاً يحالتوي على خميرة ونضعه على شريحة زجاجية وننشره ثم نحركه بالهواء ليجف ونثبته بالتسخين بامراره على اللهب

2- نضيف عدة قطرات من صبغة methylene blue لمدة 2 دقيقة

3- نغسل الشريحة الزجاجية بالماء المقطر ونتركه يجف نفحصه بالمجهر

كما يمكن ملاحظة حركة الخمائر بوضع قطرة من المحلول الحاوي على الخمائر بوسط شريحة زجاجية ونغطيها بغطاء ونلاحظها بالمجهر

الاعفان Molds

يمكن تنمية العفن باللمختبر على اوساط غذائية طبيعية كالفواكه والخضر أو صناعية كالوسط

Malt extract agar ، Potato dextrose agar وتظهر مستعمرات العفن ملونة بألوان مختلفة نامية على سطح الوسط الغذائي بعد الحضن على درجة حرارة معينة ولفترة زمنية معينة . وتكون المستعمرات كبيرة وملونة مقارنة بمستعمرات البكتريا والخمائر وتفحص الاعفان كالاتي :

نضع قطرة ماء صغيرة على الشريحة الزجاجية في المنتصف ، بعد ذلك ننقل باللوب المعقم جزء من مستعمرة فطرية ونضعه على قطرة الماء ثم نضع فوق الشريحة غطاء زجاجي رقيق ثم يفحص تحت المجهر ولا نستعمل العدسة الزيتية فنلاحظ اشكال الاعفان واذا كانت بحالة تزاوج او تكاثر يمكن مشاهدته ايضاً لكن لا يمكن رؤية التركيب الداخلي للعفن لذا نلجأ الى طريقة ثانية اكثر صعوبة تسمى slid culture technique وهذه الطريقة كما يلي :

1- نأخذ شمع ذائب ونرسم بواسطته مربع ناقص ضلع على الشريحة الزجاجية ثم ناخذ غطاء زجاجي ونمرره على اللهب حتى يصبح دافئاً وبعد ذلك نضعه فوق المربع الناقص الضلع

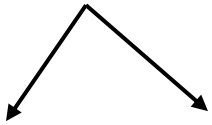
2- نلقح وسط غذائي صلب وهو في حالة سائلة بواسطة العفن المراد دراسته وهو الوسط هو

Malt extract agar والذي تنمو عليه الاعفان بعد ذلك نأخذ هذا الوسط الغذائي ونضعه بين الشريحة والغطاء ثم نتركه ليتصلب

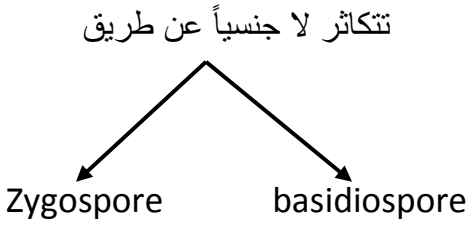
3- نضع هذا الشريحة على اناء يحتوي ورق ترشيح مضاف اليه القليل من الماء ثم نضعه في الحاضنة بدرجة حرارة 25-30 مْ لمدة 2-4 ايام مع ترطيب ورقة الترشيح اثناء مدة الحضن

4- بعد انتهاء مدة الحضن ناخذ هذه الشريحة ونفحصها بالمجهر يصبح باستطاعتنا مشاهدة التراكيب الداخلية للاعفان بصورة واضحة

تتكاثر الاعفان لا جنسياً عن طريق



Sporangia spore conidia spor



المحاضرة السابعة

عد الخلايا البكتيرية Enumeration of bacteria cell

تعد الخلايا البكتيرية بطريقتين :

1- طريقة العد المجهري المباشر : Direct Microscope Count - (D M C)

يتم بواسطة شريحه زجاجية اذ تثبت عليها اللطخة وتنشر على مساحة مناسبة ويتم تصبيغها بصبغة METHYELEN BLUE بعدها تفحص تحت المجهر ونبدأ بالعد وهي تعطي عددا كليا للخلايا الميتة و الحية وتعد من الطرق البسيطة .

2- غرفة العد Counting chamber

توجد شرائح زجاجية خاصة تكون مقسمة من الداخل الى مربعات صغيرة عددها 64 مربعاً مقسمة الى اربعة مربعات كبيرة ، وكل مربع منها يحتوي على 16 مربع صغير ، ويبلغ طول ضلع المربع الصغير(1\20) ملم وارتفاع (1\10) ملم .

طريقة العمل :

ناخذ حجم معين من مزرعة سائلة وننقله الى حجرة العد عن طريق اخدود او شق موجود على الشريحة وينشر في الحجم داخل الشريحة ويوضع تحت المجهر ونبدأ بالعد ، نحسب بكل مربع كبير اعداد البكتريا الموجودة ونحسب في المربع الثاني والثالث والرابع .

من مساوئ الطريقة المباشرة انها تعطي عدد الخلايا الحية والميتة وبعض الشوائب ودقائق الصبغ في حالة التصبيغ .