البكتريا
التمارين المعملية الاساسية

obeikandl.com

obeikandl.com

البكتريا

الجزء الثانى
التمارين المعملية الأساسية

دكتور/ مصطفى كمال أبو الذهب
أستاذ ورئيس قسم أمراض النبات
كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

دكتور/ محمد عبد القادر الجعرانى
أستاذ أمراض النبات
كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

obeikandl.com

دار المطبوعات الجديدة
٥ ش سان مارك خلف سنترال المنشية

obeikandl.com

بسم الله الرحمن الرحيم

obeikandl.com

obeikandl.com

بسم الله الرحمن الرحيم

تقديم

تختلف علوم الحياة عن العلوم الإنسانية فى إرتباطها الوثيق بالمعمل ، فالدراسات المعملية تعتبر المصدر الوحيد لإضافة الجديد من المعلومات إلى هذا الطراز من العلوم . ولاشك فى أن هذه الإضافات العلمية الجديدة ، هى ثمار جهد أياد قد دربت تدريباً معملياً على أساس علمى سليم أكسبها خبرة ومرانا .

وعلم البكتيريا ، شأنه شأن باقى علوم الحياة ، يتطلب من دارسيه رصيداً كبيراً من الخبرة المعملية للربط بين النتائج المعملية والنظريات العلمية ، الأمر الذى قد ينتج عنه إضافات جديدة للعلم .

ويعرض هذا الكتاب ، بعض التمارين المعملية الأساسية لعلم البكتيريا ، مع شرح الأساس العلمى لكل تمرين بطريقة مبسطة ، وسرد للخطوات اللازمة لإجرائه ، مع مراعاة الإمكانيات المتاحة فى معظم معامل البكتيريا بكليات الجامعات العربية .

والله نسأل أن يكون وافياً بالغرض نافعاً ومفيداً ، ، ،

اسكندرية فى مارس ١٩٨٣

المؤلفان

obeikandi.com

obeikandl.com

المحتويــات

الصفحة

١ – بيئات الزرع ١

تقسيم بيئات الزرع ٢

بعض المواد الهامة التى تدخل فى تركيب البيئات الغذائية ... ٥

قياس وتعديل تفاعل البيئة (قيمة الـ pH) ١٠

إعداد بيئة المرق المغذى ١٦

إعداد بيئة الآجار المغذى ١٨

٢ – التعقيم ٢٠

الطرق الفيزيائية ٢٠

أولا – الحرارة ٢٠

(ا) التعقيم بالحرارة الجافة ٢٠

١ – أفران الهواء الساخن ٢٠

٢ – اللهب المباشر لدرجة الاحمرار ٢٢

٣ – التلهيب الكحولى ٢٣

(ب) التعقيم بالحرارة الرطبة ٢٤

١ – معقم أرنولد ٢٤

٢ – الأوتوكلاف ٢٨

ثانياً – الاشعاعات ٣٤

الطرق الكيميائية ٣٥

الطرق الميكانيكية ٣٨

صفحة

١ — مرشح زايتس ٤٠
٢ — مرشحات الزجاج المسامى ٤١
٣ — المرشحات الغشائية أو الجزيئية ٤٤
اختبار كفاءة طرق التعقيم ٤٥
٣ — عزل البكتيريا فى مزارع نقية ٤٦
طريقة التخطيط على سطح الآجار المتصلب... ... ... ٤٧
تلقيح الآجار العميق والآجار المائل ٥١
طريقة الأطباق المصبوبة.. ... ... ٥٢
طرق الإحتفاظ بالمزارع النقية ٥٥
٤ — الصفات المزرعية ٥٨
وصف المستعمرات الفردية النامية على سطوح البيئات الصلبة ٥٨
وصف النمو على الآجار المائل ٦٠
النمو فى بيئة المرق المغذى ٦٢
٥ — الميكروسكوب المركب ٦٤
التكبير ٦٨
طول الموجة الضوئية ٦٩
الشيئيات وقوة التفصيل (قوة التمييز) ٧٠
البعد البؤرى المكافىء ٧٤
مسافة الفحص ٧٤
الشيئيات المغموسة فى الزيت... ... ... ٧٤

صفحة

المجهر ذو الحقل المظلم ٧٥
الدراسات المجهرية بإستعمال الإشعة فوق البنفسجية ٧٧
الدراسات المجهرية الفلورسنتية ٧٧
الفحص المجهرى بإستعمال طريقة الأطوار المتباينة.. ... ... ٧٨
الطريقة الإلكترونية للفحص المجهرى ٨٠
٦ – فحص حركة البكتيريا ٨٦
٧ – صبغ البكتيريا ٨٩
نظرية الصبغ ٩٢
معمق اللون... ... ... ٩٤
الصبغ البسيط ٩٤
الصبغ المركب ٩٧
صبغة جرام ٩٧
الصبغة المقاومة للاحماض ١٠١
صبغ الغلاف.. ... ... ١٠٤
صبغ الأسواط ١٠٥
صبغ الجراثيم ١٠٧
الصبغ السالب ١١٠
قياس حجم الخلايا البكتيرية المصبوغة ١١١
٨ – التقدير الكمى للنمو البكتيرى ١١٤
أولا – التقدير المباشر لعدد الخلايا ١١٤

صفحة

ثانيا – التقدير غير المباشر لعدد الخلايا. ١١٧
ثالثا – تقدير الوزن الجاف للخلايا ١١٩
رابعا – تقدير الآزوت الكلى بالخلايا.. ... ... ١٢٠
خامسا – تقدير درجة التعكير ١٢٢
سادسا – تقدير درجة انتاج الحمض بالمزرعة ١٢٣
٩ – العوامل البيئية وتأثيرها على البكتيريا ١٢٥
أولا – العوامل الفيزيائية ١٢٥
١ – تأثير الحرارة ١٢٥
(ا) تقدير درجة الحرارة المثالية لبعض البكتيريات... ... ١٢٦
(ب) تقدير معدل موت الخلايا البكتيريا نتيجة
لارتفاع الحرارة ١٢٧
٢ – تأثير الاشعاع ١٢٨
٣ – تأثير الضغط الأسموزى ١٣٠
٤ – تأثير الجفاف ١٣٢
٥ – تأثير تركيز أيون الايدروجين ١٣٤
٦ – تأثير التوتر السطحى ١٣٦
٧ – تأثير التهوية... ... ... ١٣٧
(ا) طريقة الآجار العميق... ... ... ١٣٧
(ب) طريقة حمض البيروجاليك ١٣٨
ثانيا – العوامل الكيماوية ١٣٩
١ – تأثير المعادن الثقيلة ١٣٩

صفحة

٢ — تأثير الصبغات ١٤٠
ثالثا — العوامل الحيوية.. ... ... ١٤٢
أولا — التضاد الطبيعى ١٤٣
ثانيا — دراسة تأثير التخضيرات التجارية من المضادات
الحيوية ١٤٥
١٠ — الانزيمات البكتيرية ١٤٩
إنزيمات التحلل المائى.. ... ... ١٤٩
(ا) تحلل النشا ١٥٠
(ب) تحلل السيليولوز ١٥٢
(ج) اسالة وتحلل الجيلاتين... ... ... ١٥٥
(د) تحلل الكازين... ... ... ١٥٧
(ه) تحلل الإحماض الأمينية ١٥٨
(و) تحلل الدهن ١٦٢
إنتاج الأمونيا ١٦٣
إنزيمات الاكسدة ١٦٤
اختزال صبغة أزرق الميثيلين. ١٦٥
اختزال فوق أكسيد الايدروجين ١٦٦
اختزال النترات ١٦٧
نشاط الأوكسيديز ١٦٨
تخمر الكربوايدرات ١٦٩

صفحة

الكشف عن بعض المواد الهامة الناتجة عن تخمير السكريات ١٧١
اختبار فوجس بررسكاور ـ أحمر الميثيل.. ... ... ١٧١
اختبار تكون حمض البيوتريك ١٧٢
إختبار تكوين كحول الإيثايل ١٧٣
التغيرات التى تحدثها الاحياء الدقيقة فى بيئة ابن عباد
الشمس ١٧٤
تحلل الأسكيولين ١٧٦
إنتاج مواد مختزلة من السكروز ١٧٦
إنتاج كيتوجلوكونات ١٧٦
إنتاج الليفان ١٧٧
١١ ـ التعرف على الانواع البكتيرية... ... ... ١٧٨
١٢ ـ التطفر ١٨٢
عزل الطفرات المختلفة فى صفاتها المزرعية ١٨٣
عزل طفرات مقاومة للمضادات الحيوية ١٨٥
عزل الطفرات المختلفة فى قدرتها المرضية ١٨٨
١٣ ـ بعض الكائنات الحية الدقيقة الاخرى غير البكتيريات الحقيقية ١٩١
١ ـ الاسبيروكيتات ١٩١
٢ ـ الاكينوميسيتات ١٩٢
٣ ـ الطحالب ١٩٤
٤ ـ الفطريات ١٩٤

صفحة

٥ – البروتوزوا ١٩٥

١٤ – بعض التطبيقات الزراعية لعلم البكتيريا ١٩٧

أولا – البكتيريا النباتية (البكتيريا الممرضة للنبات) ١٩٧

ثانيا – بكتيريا التربة ٢٩٨

ثالثا – بكتيريا الالبان ٢٠٠

(ا) دراسة بكتيريا حمض اللاكتيك ٢٠٠

(ب) اختبار تلوث اللبن المبستر والمياه ٢٠١

رابعا – بكتريا الأغذية ٢٠٤

(ا) اختبار كفاءة تعقيم المعلبات ٢٠٤

(ب) التسمم الغذائى البكتيرى ٢٠٦

ملحق ١ – البيئات الغذائية ٢٠٨

ملحق ٢ – الصبغات والمحاليل التى تستعمل فى طرق الصبغ المختلفة ٢١٥

ملحق ٣ – المحاليل ٢٢٠

المراجع ٢٢٤

obeikandl.com

بيئات الزرع CULTURE MEDIA

إن غالبية الدراسات والبحوث البكتريولوجية تتطلب أستعمال بيئات زرع مختلفة تحضر بالمعمل ، وهذه البيئات وإن لم تكن مماثلة تماماً مع البيئات التى تعيش فيها أو عليها هذه الكائنات فى الطبيعة إلا أنها قريبة الشبه منها قرباً قد يوفر الإحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازمة لتنميتها .

والبكتيريات عموماً ليست مماثلة فى احتياجاتها الغذائية فهى تختلف فى ذلك اختلافا بيناً لقدراتها على تخليق ماتحتاجه من مصادر الغذاء . فبينما نجد بعض البكتيريات ذات القدرة البنائية المرتفعة يمكنها أن تخلق إحتياجاتها الكربونية العضوية المعقدة من ثانى أكسيد الكربون فاننا نجد أن البعض الآخر لايقدر على ذلك نظراً لنقص قدرته البنائية ، لذلك فهى تتطلب مصدراً من الكربون أكثر تعقيداً كالكربوايدرات . وبالمثل بينما نجد هناك بعض البكتيريات تتطلب مصدراً للنيتروجين فى صورة بسيطة كالنيتروجين الجوى أو فى صورة أملاح غير عضوية كأملاح الأمونيوم ، فاننا نجد بعضاً آخر منها يحتاج إلى النيتروجين فى صورة عضوية معقدة مثل الأحماض الأمينية . وعلاوة على مصدرى الكربون والنيتروجين فان البيئة الغذائية المستعملة يجب أن تحتوى على بعض العناصر المعدنية مثل الصوديوم ، والبوتاسيوم ، والكالسيوم ، والمغنسيوم ، والمنجنيز ، والحديد ، والزنك ، والنحاس ، والفوسفور ، والكوبالت . وكذلك يجب أن تحتوى بيئة الزرع فى بعض الحالات الخاصة على عوامل النمو كالفيتامينات أو المواد الشبيهة بالفيتامينات ، حيث أن البكتيريات تختلف فى أحتياجاتها من هذه المواد أيضاً ، فبعضها يخلق الفيتامينات التى يحتاجها بنفسه من مكونات البيئة البسيطة ، والبعض الآخر لاينمو إلا إذا

obeikandi.com

أضيف إلى بيئة الزرع واحد أو أكثر من هذه الفيتامينات . والبكتيريات ككل الكائنات الحية ، تحتاج إلى الماء وهى فى ذلك كالخلايا النباتية حيث أن العناصر الغذائية يجب أن تكون ذائبة فى الماء قبل أن تدخل إليها . وعلاوة على توفر الإحتياجات الغذائية المختلفة يجب أن يكون تركيز أيون الإيدروجين ، بالبيئة مناسباً للنوع البكتيرى المراد تنميته .

من كل ذلك يلاحظ أن بيئات الزرع هذه تختلف فى تركيبها إختلافاً يتلاءم مع طبيعة وحاجة الكائن الحى المنمى فيها أو عليها ، غير أن هناك ، بكتيريات لايمكن تنميتها فى بيئات زرع صناعية حتى ولو وفرنا بها كل الاحتياجات الغذائية المعروفة ، ومثل هذه الكائنات تعرف عادة بالطفيليات الإجبارية فهى التى لاتنمو إطلاقاً إلا على الأنسجة الحية لعوائلها أو فيما يسمى بمزارع الأنسجة Tissue culture

تقسيم بيئات الزرع

١ـ بيئات محددة التركيب الكيماوى Chemically defined media

تتكون من مواد ذات تركيب كيماوى محدد . وعلى ذلك فهى تتكون من . أملاح غير عضوية ، أو مخلوط من الأملاح غير العضوية ومركبات عضوية ونظراً لأن التركيب الكيماوى لكل مكونات البيئة التركيبية يكون معروف ومحدد ، فانه يمكن تكرار تجهيز مثل هذه البيئات بنفس الدقة فى كل مرة من مرات التحضير ، ولعل ذلك من أهم مميزات البيئات محددة التركيب الكيماوى مما أدى إلى استعمالها فى دراسة المتطلبات الغذائية لأنواع البكتيريا المختلفة .

٢ ـ بيئات غير محددة التركيب الكيماوى Chemically nondefined media

تتكون من مكونات غير محددة التركيب الكيماوى . مثل البيئات التى يدخل

obeikandi.com

فى تركيبها المواد الطبيعية كمستخلص اللحم والدم أو سيرم الدم أو الببتون أو مستخلصات الأنسجة النباتية أو الحيوانية . ولما كان التركيب الكيماوى الدقيق لمثل هذه المواد غير محدد ويختلف بأختلاف المادة الطبيعية المستعملة لذلك كان من الصعب عملياً تكرار تحضير مثل هذه البيئات بنفس التركيب وبنفس الدقة فى كل تحضير .

وكذلك يمكن تقسيم البيئات على أساس قوامها إلى :

(ا) بيئات صلبة Solid media : مثل شرائح البطاطس أو الجزر .

(ب)بيئات صلبة قابلة للاسالة Solid - reversible to liquid

مثل البيئات التى يدخل فى تركيبها الآجار أو الجيلاتين .

(ج) بيئات نصف صلبة Semisolid media : تحتوى على كمية من الآجار لاتزيد عن ربع الكمية التى تضاف إلى البيئات الصلبة القابلة للاسالة تبعاً لنوع الآجار المستعمل .

(د) بيئات سائلة Liquid media : مثل بيئة اللبن أو بيئة المرق المغذى

وبالإضافة إلى ذلك توجد بيئات ذاتأغراض خاصة Special - purpose media لسهولة تنمية وعزل مجموعات معينة من البكتيريا مثل :

١ - البيئات المقواة Enriched media

إذا أضيف الدم أو سيرم الدم أو مستخلص الأنسجة النباتية أو الحيوانية إلى بيئة المرق أو الاجار المغذى أدى ذلك إلى إمداد البكتيريا باحتياجات ، غذائية إضافية ، وبذلك يمكن تنمية بعض البكتيريات غير ذاتية التغذية العنيدة والصعبة فى إنمائها Fastidious heterotrophs على مثل هذه البيئات .

٢ — بيئات انتخابية : Selective media

إن إضافة مواد كيميائية ، مانعة لنمو مجموعة من الكائنات ، إلى بيئة ، الاجار المغذي مثلا فان ذلك سيمنع نمو هذه المجموعة من البكتيريات دون أن يؤثر على نمو المجموعات الأخرى. مثال ذلك إضافة صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet بتركيز $\frac{١}{١٠٠,٠٠٠}$ إلى بيئة الزرع فان ذلك يمنع نمو معظم البكتيريات الموجبة لصبغة جرام ولايتأثر بها نمو البكتيريات السالبة لهذه الصبغة .

٣ — بيئات تفريقية Differential media

إن إضافة مادة طبيعية أو كيمائية معينة إلى بيئة الزرع قد يسمح بالتميز بين نمو المجاميع المختلفة من البكتيريا . فمثلا إذا لقحت بيئة آجار الدم بمخلوط من البكتيريا فإن بعض البكتيريات قد تحلل خلايا الدم الحمراء ، فى حين أو البعض الآخر لن يستطيع ذلك . وأن وجود منطقة رائقة حول المستعمرة يعتبر دليلا على التحلل . ويمكن بالتالى التميز بين البكتيريات المحللة للدم وغير المحللة له Hemolytic and nonhemolytic . ويلاحظ أن بيئة آجار الدم هذه تعتبر بيئة مقواه وتفريقية فى نفس الوقت .

٤ — بيئات التقدير الحيوى Biological assay media

هى نوع من البيئات محددة التركيب الكيماوى تستعمل فى أغراض . التقدير الكمى الحيوى لنوع معين من الفيتاميتات أو الأحماض الأمينية بطريقة حيوية . وعادة تنمى عليها سلالات معينة من البكتيريا تحتاج إلى الفيتامين أو الحمض الأمينى المراد تقديره حيوياً . وتباع مثل هذه البيئات مجهزة عادة بالاسواق .

obeikandi.com

٥ – **بيئات عد البكتريا :** Media for enumeration of bacteria

أنواع معينة من البيئات المحددة التركيب الكيماوى تستعمل لتقدير تعداد البكتيريا فى اللبن أو الماء . ويعتمد تركيب البيئة على نوع المجموعة البكتيرية المراد عدها . وتباع هذه البيئات مجهزة بالأسواق .

٦ – **بيئات التعرف على البكتيريات :** Media for characterization of bacteria

هناك عديد من البيئات الغذائية التى يمكن عن طريقها تحديد النوع البكتيرى عن طريق قدرته على إحداث بعض التغيرات الكيماوية المعينة بها . ومن أمثلتها بيئة أحمر الميثيل وفوجس بروسكاور Methyl red, Voges-proskauer medium وبيئة لبن عباد الشمس وبيئة آجار أحمر الكونجو Cengo red agar .

بعض المواد الهامة التى تدخل فى تركيب البيئات الغذائية

١ – **الماء :** يستعمل الماء كمادة حاملة للمواد الغذائية فى البيئة علاوة على إحتياج الخلايا إليه لنموها ولتغذيتها ولعملياتها الأيضية الأخرى . ويفضل أستعمال الماء المقطر عن ماء الصنبور نظراً لأن تركيبه الكيماوى محدد وخلوه نسبياً من الأملاح المعدنية ، وذلك لأن أيونات الكالسيوم والمغنسيوم التى توجد فى ماء الصنبور تتفاعل مع الفوسفات الموجودة بالبيتون ومستخلص اللحم ، لتكون فوسفات الكالسيوم والمغنسيوم غير الذائبة .

٢ – **البيتون:** Peptone : يستعمل كأهم مصادر النيتروجين العضوى فى البيئات الغذائية اللازمة لتنمية البكتيريات غير ذاتية التغذية . وهو عبارة عن ناتج وسطى أثناء التحلل الإنزيمى للبروتينات . والتحضيرات التجارية من البيتون عبارة عن مسحوق جاف يحضر من اللحم الأحمر (الخالى من الدهن) بعد هضمه بانزيم البيبسين الذى يساعد على التحلل المائى للبروتين غير القابل

الفوبان والذى يوجد فى اللحم فيحيله إلى خليط قابل للذوبان من عديد وثنائى البيتيد والأحماض الأمينية ويسمى هذا الخليط بالببتون . وهناك مركب مماثل يعرف بالتريبتون يجهز من اللحم الأحمر باستعمال إنزيم التريبسين بدلا من ، البيسين فى محلول مائى متعادل أو مائل للقلوية ويمكن تحضير الببتونات بالتحليل المائى الجزئى للكازين أو لأى مواد بروتينية نباتية عند تسخينها فى وجود بعض الأحماض وتشبه نواتج التحليل الحمضى للبروتينات ، الببتونات والتريبتون المحضرة إنزيمياً إلى حد كبير . وعادة يضاف الببتون إلى بيئة بعض البكتيريات المحللة للبروتينات وذلك لتنشيط الخلايا على هدم البروتين . فمثلا قد لا تهاجم بعض البكتيريات بروتينات معينة مثل الكازين والألبيومين عندما توجد هذه المواد بالبيئة كمصدر وحيد للنيتروجين والكربون ، إذ أن هذه المركبات لا تنفذ إلى داخل الخلية إلا إذا تحللت إلى وحدات أقل تعقيداً . أما إذا أضيف إلى البيئة آثار من الببتون التجارى فان هذه البكتيريات يمكنها فيما بعد أن تهاجم هذه البروتينات وتحللها حيث أن الكائن يستغل الأحماض الأمينية الموجودة فى الببتون فى نموه وبالتالى فى إنتاجه للانزيمات المحللة لجزيئات البروتين المعقدة ، وناتج تحلل هذه البروتينات من الأحماض الأمينية يمكنه إذن أن يمر خلال أغشية الخلايا البكتيرية التى تستعمله فى بناء بروتوبلازمها الخلوى ويؤدى الببتون وظيفة رئيسية أخرى فى البيئة علاوة على كونه مصدراً ممتازاً للنيتروجين ، فهو يعمل كمادة منظمة لتفاعل البيئة وذلك لاحتوائه على الأحماض الأمينية التى تعتبر عوامل مثالية فى هذا الصدد لكونها مركبات أمفوتيرية Amphoteric compounds .

٣ — مستخلص اللحم Beef extract : يحضر بغلى اللحم ، البقرى الخالى من الدهن فى الماء ثم يحصل على المرق بالترشيح ويتم بعد ذلك تركيز هـذا

الراشح تحت تفريغ . ويحتوى هذا المستخلص على بعض الأملاح غير العضوية وبعض المواد العضوية التى يمكن الحصول عليها من أنسجة العضلات نتيجة للغليان فى الماء ، ومن بين المواد العضوية التى توجد فى مستخلص اللحم الحمض الأمينى بيتاالانين ، واليوريا ، وحمض اليوريك والجلوكوز ، وحمض ، اللاكتيك ، والسكريات السداسية المفسفرة ، وحمض السكسنيك ، وبعض الدهون ، وبعض الفيتامينات التابعة لمجموعة فيتامين ب وبعض عوامل النمو الأخرى . ويعتبر مستخلص اللحم مصدراً أساسياً للاملاح المعدنية والفيتامينات وعوامل النمو بالبيئات التى يضاف إليها .

٤ – المواد التصلبية Solidifying agents : تضاف إلى بيئة الزرع السائلة بعض المواد لتساعد على تحولها إلى بيئة تتصلب عندما تنخفض حرارتها. وتهيء البيئات المتصلبة هذه سطحاً مستويا يصلح لزرع البكتيريات عليها وتنميتها بشكل مستعمرات فردية يمكن عن طريقها الحصول على مزارع نقية. وفيما يلى بعض المواد التصلبية التى تضاف إلى بيئات الزرع : —

(أ) الجيلاتين : Gelatin

هو أول ماستعمل كمادة تصلبية فى بيئات الزرع ، وهو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات بحامض الهيدروكلوريك فتتحلل ، محتويات العظام من كربونات الكالسيوم كما تذوب محتوياته من فوسفات ثلاثى الكالسيوم ومايتبقى من العظام يكون عبارة عن مادة إسفنجية القوام صلبة تعرف بالأوسين Ossein وهذه تتكون أساسياً من مادة الكولاجين ، Collagen التى تتحول إلى الجيلاتين بمعاملتها بالماء المغلى . وعندما يبرد المخلوط الساخن فانه يتحول إلى مادة هلامية Gel تقطع وتجفف فى تيار من الهواء البارد وفى الصناعة يحضر الجيلاتين عادة نتيجة لغليان العظام مباشرة فى الماء .

والجيلاتين كما سبق أن ذكرنا مادة بروتينية تحتوى على ١٦ — ١٧ ٪ نيتروجين ، ويحتوى على حوالى ١٥ حمضاً أمينياً مرتبطة ببعضها بروابط ببتيدية ولايوجد بينها الحمض الأمينى تريبتوفان والحمض الأمينى Cysteine. والجيلاتين لايتكون من مادة واحدة مهما كان نقيا ، فهو عبارة عن مجموعة من المواد المتشابهة فى خواصها والمتقاربة فى تركيبها . والجيلاتين يذوب فى الماء المغلى ولايذوب فى الماء البارد ولكنه ينتفخ فيه . ويضاف إلى بيئات الزرع بنسبة ١٠ — ١٢ ٪ ، وإذا إرتفعت الحرارة إلى ٢٥ أو ٣٠°م فانه ينصهر ثم يتصلب مرة أخرى عندما تنخفض الحرارة ، ولكن إذا أرتفعت الحرارة إلى درجات عالية (فوق ١٠٠°م) فانه ينصهر ولا يتصلب مرة أخرى ، لذلك فان البيئات التى تحتوى على جيلاتين يجب أن تعقم باستعمال بخار الماء (١٠٠°م) تحت الضغط الجوى العادى (وسيأتى ذكر ذلك عند شرح التعقيم) إذا أستعمل الجيلاتين بنسب مرتفعة تصل إلى ١٦ ٪ أو أكثر فانه يمكن حينئذ إجراء التعقيم باستعمال الأتوكلاف (١٢٠°م لمدة ١٥ دقيقة) . والجيلاتين يتحلل مائيا فى ، درجات الحرارة العالية فى وجود الأحماض أو القلويات لذلك يجب أن نتأكد من أن قيمة الأس الإيدروجينى (pH) للبيئة المحتوية عليه حوالى ٧ قبل التعقيم .

ونظراً لأن الجيلاتين عبارة عن بروتينات فهو يعتبر مادة غذائية علاوة على كونه مادة تصلبية . فكثير من الكائنات الحية الدقيقة تفرز أنزيمات (جيلاتيناز) يمكنها عن طريقه أن تحلل الجيلاتين مائياً وتستفيد من الأحماض ، لأمينية المتحررة نتيجة التحلل (سيأتى ذكر ذلك عند مناقشة أنزيمات التحلل المائى) .

ويندر حالياً استعمال الجيلاتين كمادة تصلبية فى البيئة نظراً لأن كثير من

من البكتيريات يمكنها أن تحلله مائياً ولأنه ينصهر على درجات التحضين (إلاإذا تم التحضين عند ٢٠°م أو أقل) ، ولكنه لازال يستعمل للدراسة قدرة البكتيريا على إفراز الإنزيمات المحللة للبروتين .

(ب) الأجار أجار : Agar Agar

مادة كربوايدراتيـة تستخلص مـن بعض الطحالـب البحريـة الحمراء وبالذات بعض الأنواع التابعة للجنس *Gelidium* والتى تنمو بوفرة عـلى سواحل بعض الدول أشهرها اليابان . بعض البكتيريات مثل بعض الأنـواع التابعة للجنس *Vibrio* أو الجنس *Pseudomonas* وبعض البكتيريـات ، الهلامية مثل أفراد جنس *Cytophaga* وبعض الفطرياتالهلامية تحلل الآجار وتستفيد من الجالاكتوز الناتج . وعند تحلل الاجار مائياً ينتج د ـ جالاكتوز D - galactose ونسبة بسيطة من ل ـ جالاكتوز L -galactose وحمض الكبريتيك ، وعلى ذلك يعتبر الاجار استر جالاكتوزى لحمض الكبريتيك Galactose sulfuric ester وهذا الإستر له خواص حمضية إلا أن الاجار العـادى المستعمل هـو عبارة عن ملح الكالسيوم أو المغنسيوم لهذا الأستر . والآجار لايتأثر بدرجات حرارة التعقيم فى الأوتوكلاف (١٢٠°م) غير أنه قد يتحلل تحت ظروف التعقيم هذه إذا كان تفاعل البيئة شديد الحموضة أو شديد القلوية قبل التعقيم (PHأقل من ٧ أو أكثر من ٩) .

وعادة يضاف الاجار إلى البيئة بنسبة ٢٪ . وهو فى هذا التركيز لن يسيل قبل أن تصل درجة الحرارة إلى ٩٨°م ولكنه فى نفس الوقت يمكن تبريده حتى يصل إلى ٤٨°م دون أن يتصلب . وهو يتصلب عند درجة ٤٢ ـ ٤٥°م وإذا تصلب لايعود سائلا مرة ثانية إلا إذا ارتفعت حرارته إلى درجة ٩٨°م

وبذلك يمكن تحضين البيئة الملقحة عقب تجمدها فى درجات عالية من الحرارة دون أن نخشى سيولة البيئة . ولايخشى من تحلل الآجار بيولوجيا كما سبق أن بينا فان عدد الكائنات التى تحلله قليلة جداً .

(ج) السليكا : Silica

عندما يحمض محلول من سليكات الصوديوم Sodium silicate (الزجاج المائى Watar glass) بواسطة حمض الهيدروكلوريك أوحمض الفوسفوريك فانه ينتج حمض السليسيلك Silicic acid الذى يتخذ القوام الهلامى Gel عند درجة حرارة الغرفة ، وعندما تتصلب هذه المادة الهلامية المتكونة فانها لاتسيل مرة أخرى . وتصب هذه المادة فى أطباق بترى وبعدأن تتصلب يجب إزالة أملاح الصوديوم الزائدة منها بالغسيل بالماء لمدة كافية ثم يعقم بعدها أسطح السليكاجل المتصلبة فى كل طبق بطريقة التلهيب Flaming ثم تضاف إليه بعد ذلك المواد الغذائية المعقمة فى صورة محاليل مركزة وهذه تنتشر به بسرعة . وحيث أن السليكا لاتعتبر مادة غذائية فهى عادة تستعمل فى تحضير البيئات اللازمة لتنمية الكائنات الذاتية التغذية وذلك لمنع نمو البكتيريات غير الذاتية التغذية معها وكذلك لتجنب التأثير المثبط للمواد التصلبية العضوية كالآجار والجيلاتين والتى يؤثر وجودها على نمو بعض الكائنات ذاتية التغذية

قياس وتعديل تفاعل البيئة «قيمة الـ pH»

درجة الـ pH هى مقياس عددى للتعبير عن درجة الحموضة أو القلويـــة للسوائل أو المحاليل المختلفة والقيمة العددية هذه تشتق من المعادلة الآتية :

$$pH = \text{لو}_{١٠} \frac{١}{[\text{يد}^{+}]} = -\text{لو}_{١٠}[\text{يد}^{+}]$$

obeikandl.com

حيث [يد +] يدل على تركيز أيون الإيدروجين بالجرام فى اللتر .

وهذا المقياس العددى يتراوح بين صفر إلى ١٤ (جدول ١) . حيث أن قيمةpH ٧ تمثل حالة التعادل وأقل من ٧ تدل على زيادة الحموضة وأعلى من ٧ تدل على زيادة القلوية . ومعظم البكتريات تنمو جيداً عند درجة التعادل أو قريبة من التعادل .

ويمكن تقدير قيمة الpH لأى محلول إما بطريقة كهربائية Electrometric أو بطرق تلوينية Colorimetric فى حالة الطرق الكهربائية يستعمل جهاز يسمى الpH meter وفى حالة الطرق التلوينية يعتمد على بعض الأدلة الكاشفة Indicators التى تتخذ ألوانا مختلفة فى حدود معينة من قيمة ال pH، ويحتوى (جدول ٢) قائمة ببعض الأدلة التى يمكن أستعمالها فى الأغراض البكتريولوجية يمكن منها أختيار الدليل المناسب تبعا لمجال قيمة الpH المرغوب. ويمكن إتباع الطريقة الآتية لضبط pH البيئة باستعمال جهاز لمقارنة الألوان مثل جهاز Lovibond comparator ، وهذا الجهاز عبارة عن صندوق صغير (شكل ١) مقسم إلى قسمين ا ، ب يوضع بها أنبوبتين أحداهما تحتوى على السائل المراد قياس قيمة الpH الخاص به بعد إضافة كمية معينة من الدليل المستعمل وفى الأخرى (Blank) يوضع كمية مساوية من نفس السائل بدون إضافة دليل. يوجد بالجهاز نافذتان، النافذة المركزية تقع أمام الأنبوبة التى يوضع بها المحلول الملون ، والنافذة ، الأخرى تقع أمام المحلول عديم اللون (Blank). الجزء ج عبارة عن قرص يحتوى على قطع زجاجية صغيرة دائرية وملونة بألوان مختلفة تمثل التغيرات اللونية عند مختلف قيم الpH لدليل معين . وعند دوران القرص .

(جدول ١) : العلاقة بين تركيز أيون الايدروجين وقيمة الـ pH

التفاعل	تركيز أيون الايدروجين بالجرام لكل لتر	لوغاريتم تركيز أيون الايدروجين	قيمة الـ pH
	١,٠٠	صفر	صفر
	٠,١	١ —	١
	٠,٠١	٢ —	٢
حامضى	٠,٠٠١	٣ —	٣
	٠,٠٠٠,١	٤ —	٤
	٠,٠٠٠,٠١	٥ —	٥
	٠,٠٠٠,٠٠١	٦ —	٦
متعادل	٠,٠٠٠,٠٠٠,١	٧ —	٧
	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠١	٨ —	٨
	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠١	٩ —	٩
	,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,١	١٠ —	١٠
قلوى	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,٠١	١١ —	١١
	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠١	١٢ —	١٢
	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,١	١٣ —	١٣
	٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,٠٠٠,٠١	١٤ —	١٤

(جدول ٢) : بعض الصفات الهامة لبعض الدلائل الكاشفة التى تستعمل فى الدراسات البكتريولوجية

الدليل	كمية ص‌ايد ١,٠س لكل ٠,١ جرام من الدليل لتكوين الملح الصوديومى * مل	التركيز المطلوب من الدليل ٪ (فى محلول ٥٠٪ كحول ايثايل	مجال قيمة اا pH	تغير اللون حمضى ← قلوى
Metacresol purple مجال حمضى	٢,٦٢	٠,٠٤	١,٢ — ٢,٨	أحمر إلى أصفر
Thymol blue (مجال حمضى)	٢,١٥	٠,٠٤	١,٢ — ٢.٨	أحمر إلى أصفر
Brom phenol blue	١,٤٩	٠,٠٤	٣,٠ — ٤,٠	أصفر إلى أزرق
Brom cresol green	١,٤٣	٠,٠٤	٣,٨ — ٥,٤	أصفر إلى أزرق
Chlor cresol green	١,٩٢	٠,٠٤	٤,٠ — ٥,٦	أصفر إلى أزرق
Methyl red	—	٠,٠٢	٤,٤ — ٦,٠	أحمر إلى أصفر
Chlor phenol red	٢,٣٦	٠,٠٤	٤,٨ — ٦,٤	أصفر إلى أحمر
Brom cresol purple	١,٨٥	٠,٠٤	٥,٢ — ٦,٨	أصفر إلى أرجوانى
Brom thymol blue	١,٦٠	٠,٠٤	٦,٠ — ٧,٦	أصفر إلى أزرق
phenol red	٢,٨٢	٠,٠٢	٦,٨ — ٨,٤	أصفر إلى أحمر
Cresol red	٢,٦٢	٠,٠٢	٧,٢ — ٨,٨	أصفر إلى أحمر
Metacresol purple (مجال قلوى)	٢,٦٢	٠,٠٤	٧,٤ — ٩,٠	أصفر إلى أرجوانى
Thymol blue (مجال قلوى)	٢,١٥	٠,٠٤	٨,٠ — ٩,٦	أصفر إلى أزرق
Cresolphthalein	٢,٨٩	٠,٠٤	٨,٠ — ٩,٨	عديم اللون إلى أحمر
Phenolphthalein	—	٠,٠٥	٨,٣ — ١٠,٠	عديم اللون إلى أحمر

(*) لعمل محلول مائى من الدليل أضف كمية ص‌ايد ١,٠ أساسى إلى ٠,١ جرام من الدليل وتصحن فى هون صينى ثم يضاف إليها ماءمقطر إلى أن يصبح الحجم ٢٥٠ مل وعندئذ يكون تركيز الدليل بالمحلول ٠,٠٤٪

يسمح بتحريك الزجاج الملون ليعطى الـ Blankاللون المماثل للأنبوبة المحتوية على السائل الملون . ويلاحظ أنه يوجد قرص يحتوى على الألوان المختلفة لكل دليل على الدرجات المختلفة من pHوبالجهاز نافذة أخرى يظهر فيها رقم الـ pH المقابل عند تطابق الألوان ويتم أستعمال الجهاز باتباع الخطوات الآتية :

١ ــ أضف ١٠ مل من البيئة إلى كل من الأنبوبة ا ، ب .

٢ ــ ضع ½ مل من محلول الدليل Brom thymol blue (٠,٠٤٪) إلى الأنبوبة ب ، وضع ½ مل من الماء المقطر إلى الأنبوبة ا .

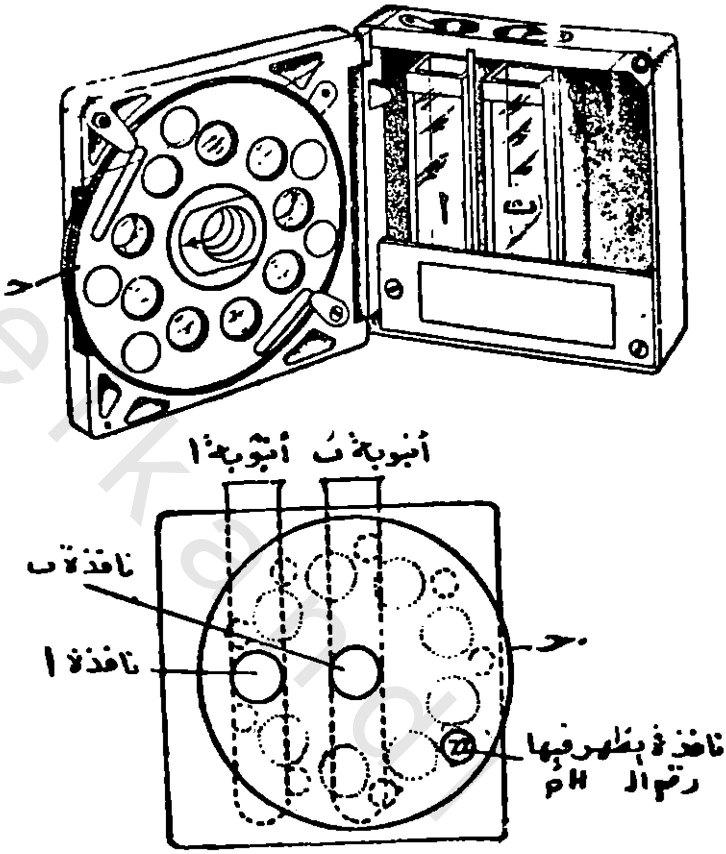
٣ ــ حرك القرص حتى تظهر قراءة ٧,٢ .

٤ ــ إذا كان اللون الظاهر خلال النافذة أمام الأنبوبة ب يماثل اللون الظاهر خلال قطعة الزجاج المستديرة الملونة (أزرق مخضر) خلال النافذة أمام الأنبوبة ا كان ذلك دليلا على أن pHالبيئة ــ ٧,٢ . إذا كان الـ pHعلى الجانب الحمضى أضف بواسطة ماصة (١مل) ص ايد ٠,١ أساسى نقطة نقطة مع الرج المستمر حتى يكون اللون الظاهر فى النافذتين متماثل تماما ثم إحسب كمية ص ايد المستعملة . أما إذا كان الـ pHعلى الجانب القلوى فيستعمل محلول يد كل ٠,١ أساسى بنفس الطريقة بدلا من محلول ص ايد .

٥ ــ إذا أضفنا ٠,٣ مل ص ايد ٠,١ س لتعديل الـ pHفى كمية ١٠ مل من البيئة حتى يصبح الـ ٧,٢pH فان الكمية اللازمة لمعادلة بقية البيئة (٩٩٠ مل)

$$= \frac{٩٩٠ \times ٠,٣}{١٠} = ٢٩,٧$$

مل . وبذلك يلزم إضافة ٢٩,٧ مل من محلول ص ايد ٠,١ س لكمية البيئة المحضرة حتى تعدل الـ pHبها إلى ٧,٢ . ويلاحظ أن



(شكل ١) : The Lovibond Comparator

(أ) ، (ب) مكان وضع الانبوبتين أ ، ب .

(ج) قرص به أقراص الزجاج الملون القياسى .

إضافة مثل هذه الكمية الكبيرة نسبياً سيغير من تركيب البيئة لحد ما . ولذلك نقلل حجم القلوى المضاف باستعمال ٢,٩٧ مل ص ايد ١ أساسى .

٦ — يمكن الكشف عن الـ pH فى كمية ١٠ مل أخرى من البيئة بعد تعديل الـ pH حتى تتأكد من دقة العمل .

obeikandl.com

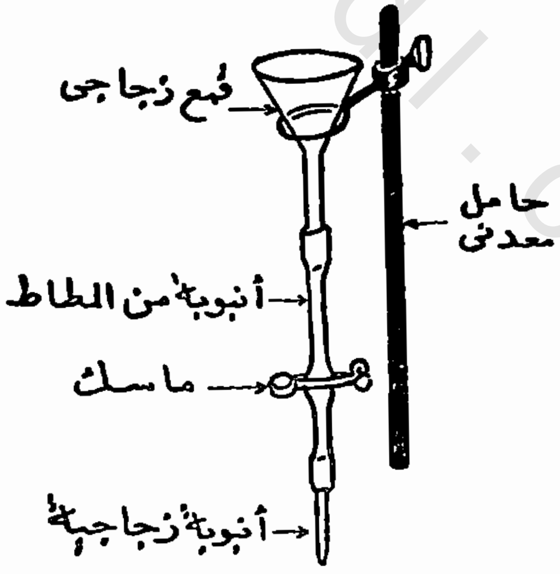
اعداد بيئة المرق المغذى

١ — ضع ٣ جرام مستخلص لحم و٥ جرام ببتون فى وعاء زجاجى ، نظيف .

٢ — أضف ١٠٠٠ مل ماء مقطر للمكونات السابقة وأخلط جيداً حتى تذوب .

٣ — إسحب بواسطة ماصة ١٠ مل من البيئة ثم قدر فيها الـ pH. قدر كمية الحامض أو القلوى اللازم إضافته لكل الكمية حتى يصبح الـ pH ٧,٢ (أنظر طريقة قياس وتعديل الـ pH صفحة ١٠) .

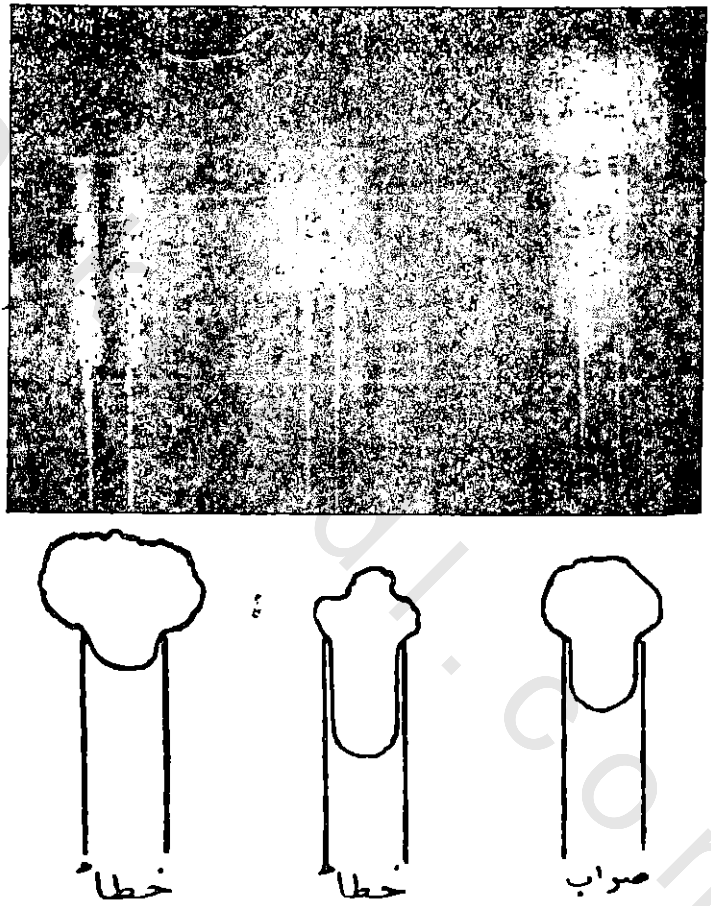
٤ — عبئ البيئة فى أنابيب أو فى زجاجات أو دوارق مخروطية بأحجام مناسبة ، مع إستعمال قمع للتعبئة (شكل ٢) .



شكل (٢) قمع لتعبئة البيئات

٥ ــ سد الأنابيب بسدادات من القطن أو المعدن أو البلاستيك (شكل ٣)

٦ ــ ضع الأنابيب المعبأة المغطاة فى سبت سلك ، ثم عقم البيئة بعد ذلك فى الأتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة (١٢١ْم ــ ١٥ رطل / بوصة مربعة)



(شكل ٣) : الصورة العليا ــ سدادات من القطن ، والبلاستيك ، والمعدن . الصورة السفلى سدادات من القطن ، لاحظ أن السدادة الصحيحة كبيرة الحجم بحيث تملأ فوهة الأنبوبة ، وطول الجزء داخل الأنبوبة وبخارجها متساو (¾ بوصة) .

الدراسات

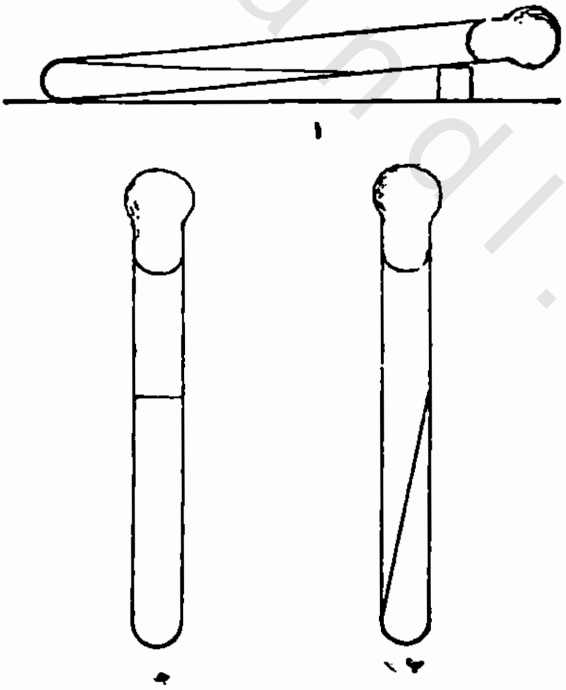
obeikandl.com

اعداد بيئة الاجار المغذى

١ — حضر لتر من بيئة المرق المغذى بالطريقة السابقة .

٢ — بعد ضبط الpH أضف ١٥ — ٢٠ جرام آجار ، ثم ضع الوعاء فى حمام مائى على درجة ١٠٠°م حتى ينصهر الآجار تماماً .

٣ — تعبأ الأنابيب باستعمال قمع التعبئة (شكل ٢) . ويملأ $\frac{٢}{٣}$ الأنبوبة للحصول على آجار عميق Deep agar ، أو $\frac{١}{٣}$ الأنبوبة للحصول على آجار مائل Slanted agar (شكل ٤) ، وتسد الأنابيب بسدادات قطنية ، وتوضع فى سبت من السلك ثم تعقم فى الأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة (١٢١°م — ١٥ رطل / بوصة مربعة) .



(شكل ٤) : ا — قمة الأنبوبة محملة على جسم مرتفع ليتصلب الآجار متخذا سطحا مائلا
ب — آجار مائل جـ — آجار عميق .

obeikandl.com

٤ - بعد إخراج الأنابيب من الأوتوكلاف يكون الآجار منصهراً ، تترك البيئة بالأنابيب لتبرد ويتصلب الآجار بها وهى قائمة للحصول على آجار عميق . وللحصول على آجار مائل تترك البيئة لتبرد ويتصلب الآجار بها وقمة الأنابيب محملة على جسم مرتفع نسبياً فيتصلب الآجار بها متخذاً سطحاً مائلا فى داخل الأنبوبة (شكل ٤) .

ملحوظة : يمكن تعبئة البيئة أيضاً فى زجاجات أو فى دوارق مخروطية .

obeikandi.com

التعقيم STERILIZATION

إن معظم الدراسات الميكروبيولوجية تعتمد على المزارع النقية أى التى ينمو بها نوع واحد من الكائنات الدقيقة ، وهذه تتطلب لنموها بيئات غذائية معقمة . والتعقيم عبارة عن العمليات التى من شأنها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمة سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة أو أماكن أو مسطحات محدودة فى أبعادها وأحجامها. والأشياء المعقمة يمكن الإحتفاظ بها على صورة معقمة طالما أمكن المحافظة عليها من التلوثات الخارجية .

وعادة يتم التعقيم باتباع طرق تعتمد على أسس فيزيائية أو كيميائية أو ميكانيكية .

الطرق الفيزيائية Ph ysical methods

تعتبر الحرارة المرتفعة وكذلك بعض الإشعاعات من أهم العوامل الفيزيائية التى تستعمل فى أغراض التعقيم ، غير أن التعقيم الحرارى هو أكثر أنواع التعقيم شيوعاً .

أولا ـ الحرارة

(١) التعقيم بالحرارة الجافة : Dry heat sterilization

١ ـ أفران الهواء الساخن : Hot air ovens

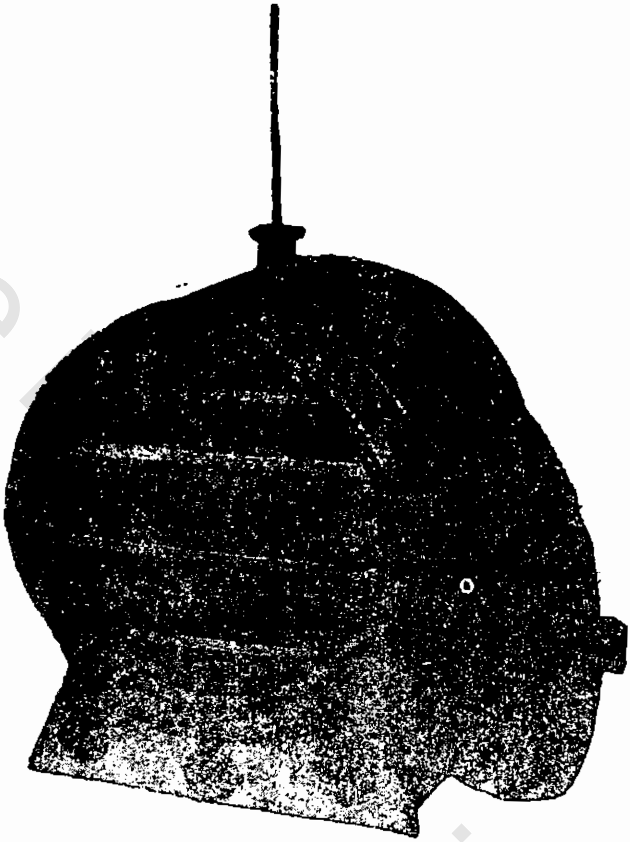
يستعمل فى هذا الغرض أفران تعرف بأفران الهواء الساخن يسخن فيها الهواء ، كهربائيا (شكل ٥) ، أو باستعمال الغاز ، فترتفع درجة الحرارة

الهواء المحيط بالأدوات المراد تعقيمها حتى تصل إلى درجة تتراوح بين ١٦٠-١٨٠°م ويترك هكذا لمدة تتراوح بين ٢ – ٣ ساعات يتم بعدها التعقيم .

ويتم قتل الكائنات الحية الدقيقة التى تكون ملوثة للأدوات المعقمة بالحرارة الجافة ، نتيجة للتجفيف السريع الذى يطرأ على خلاياها ، وكذلك نتيجة لأكسدة المحتويات الخلوية الجافة .

وتتبع هذه الطريقة فى تعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الاختبار ، والماصات والدوارق الفارغة وأطباق بترى وغيرها من الأدوات الزجاجية الأخرى التى يرغب فى تعقيمها . ويجب ملاحظة أن هذه الطريقة لاتتبع فى تعقيم كل مايخشى عليه من الجفاف مثل البيئات الغذائية والمحاليل المائية وغيرها ولكن يمكن إتباعها فى تعقيم بعض الزيوت المعدنية مثل زيت البرافين وكذلك الزيوت النباتية المختلفة .

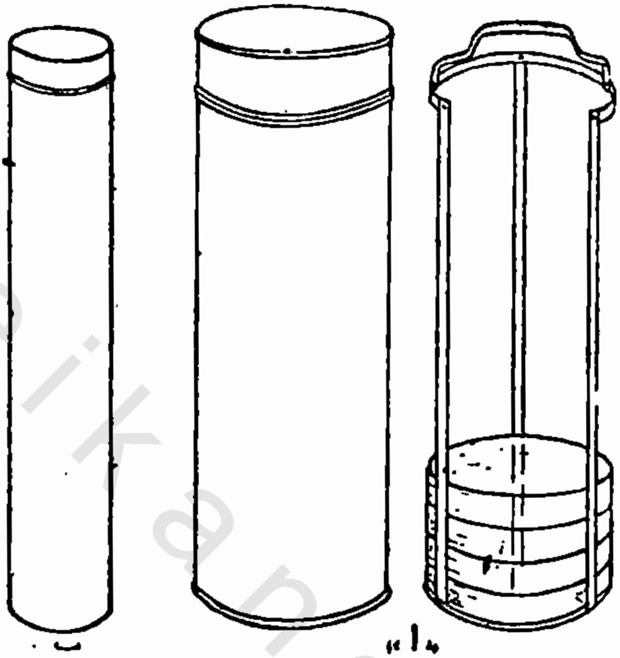
وعندما نتبع هذه الطريقة لتعقيم الادوات الزجاجية يراعى أن توضع الماصات وأطباق بترى فى أوعية معدنية أو نحاسية خاصة ذات غطاء يحكم غلقه قبل تعقيمها (شكل ٦) ، وتتلخص خطوات التعقيم بهذه الطريقة بأن توضع الادوات الزجاجية أو العلب المعدنية المحتوية عليها بالفرن وهو على درجة حرارة الغرفة ثم يحكم قفله ، وترفع درجة حرارة الفرن إلى الدرجة المطلوبة ، وهنا نبدأ فى حساب فترة التعقيم . وبانتهاء الفترة المطلوبة يوقف التسخين ويترك الفرن ليبرد تدريجياً حتى درجة حرارة الغرفة تجنباً لكسر الادوات الزجاجية أو تلوثها بالهواء الجوى الذى قد يندفع إليها إذا ماأخرجت من الفرن وهى لازالت ساخنة ،ويفضل تغليف الفوهات باستعمال رقائق الألمنيوم .



(شكل ٥) : فرن الهواء الساخن (يعمل بالكهرباء) ويستعمل فى أغراض التعقيم الحرارى الجاف

٢ — اللهب المباشر لدرجة الإحتراق : Incineration heat

عادة يستخدم اللهب المباشر من مصباح بنزن فى تعقيم إبر التلقيح المستقيمة أو ذات العقدة ، وذلك بتسخينها حتى درجة الإحمرار . وعادة تصنع مثل هذه الإبر من أسلاك رفيعة من البلاتين أو خليط من النيكل والكروم . وهذه المعادن عادة تسخن بسرعة وتفقد حرارتها بسرعة فعندما تسخن لدرجة الإحمرار يهلك كل مايلوثها من الكائنات الحية الدقيقة ، وبعد أن تترك لتبرد



(شكل ٦) : أ– علبة معدنية توضع بها أطباق بترى قبل التعقيم فى فرن الهواء الساخن (إلى اليمين) لاحظ الحامل الداخلى الذى ترص به الأطباق . ب – علبة معدنية توضع بها الماصات قبل التعقيم فى فرن الهواء الساخن .

لفترة ثوان قليلة تستعمل فى تلقيح المزارع النقية . ويجب أن تتخذ الحيطة أثناء عملية تسخين هذه الإبر حتى لاتنتثر الاجزاء التى تكون عالقة عليها قبل أن تهلك محتوياتها من الكائنات الدقيقة . فقد تحمل القطرات الصغيرة المتناثرة بعض خلايا البكتيريا الحية . ويمكن تلافى ذلك بتجفيف الإبر أولا خارج منطقة اللهب وذلك بتقريبها منه لفترة بسيطة قبل وضعها بعد الجفاف كلية فى اللهب المباشر .

٣ – التلهيب الكحولى : Alcohol flaming

يمكن تعقيم بعض الادوات كالمشرط أو الملقط أو المقص وذلك بغمر

الجسم المراد تعقيمه فى كحول إيثايل ، ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل مايعلق به من كحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التى تكون عالقة به . وبتكرار هذه العملية أكثر من مرة تزداد كفاءة هذه الطريقة فى التعقيم . وتتميز هذه الطريقة بسرعتها إلا أنه يجب أستعمال الادوات التى تعقم عن هذا الطريق مباشرة بعد تعقيمها .

(ب) التعقيم بالحرارة الرطبة : Moist heat ;

يقصد بالتعقيم عن طريق الحرارة الرطبة إستغلال بخار الماء فى إجراء ، التعقيم بدلا من الهواء الساخن . وقد يستغل بخار الماء مباشرة أو أن يضغط إلى درجة تصل إلى ضعف الضغط الجوى العادى حيث تزداد درجة حرارة البخار تحت الضغط المرتفع .

وعادة تكون الحرارة الرطبة أكثر كفاءة فى قتل الخلايا الحية من الحرارة الجافة وذلك لأنها أكثر قدرة على التغلغل داخل الخلايا ، كما أنها ذات قدرة أسرع على تجميع وتخثير Ccagulation البروتين الحاوى . فالحرارة الرطبة تفسد الطبيعة الغروية التى تميز البروتوبلازم الحى ، والتى تعتمد عليها حياة الخلية . وهذا يعنى أن زيادة المحتوى المائى للبروتين يؤدى إلى تخثره على درجات حرارة أقل مما لو كان البروتين جافا و جدول ٣ يبين هذه الظاهرة فى حالة البيومين البيض .

وفيما يلى وصف لطرق التعقيم بالحرارة الرطبة والأجهزة المستعملة فيها :

١ — معقم أرنولد : Arnold sterilizer

عبارة عن وعاء معدنى (شكل ٧) مبطن بطبقة عازلة للحرارة ذو أرفف مثقوبة لتسهل تسرب البخار إلى كل أجزاء الجهاز وله فتحة فى قمته يوضع بها

جدول (٣) : تأثير المحتوى المائى لألبيومين البيض على تجمعه أو تخثره بواسطة الحرارة المرتفعة

النسبة المئوية للماء الموجود	نقطة التجمع والتخثر Coagulation Point °م
٥٠	٥٦
٢٥	٧٤ — ٧٨
١٨	٨٠ — ٩٠
٦	١٤٥
صفر	١٦٠ — ١٧٠

ترمومتر لقياس درجه الحرارة بداخل الجهاز أثناء التعقيم . ويجب التأكد قبل تشغيل الجهاز من إحتوائه على الماء إلى الارتفاع المناسب فى الخزان الخاص بذلك . وتوضع المواد المراد تعقيمها على الارفف ويقفل الغطاء وترفع الحرارة ليغلى الماء تحت الضغط الجوى العادى ، ويحسب الوقت اللازم للتعقيم عندما تصل حرارة الجهاز الداخلية إلى درجة ١٠٠°م .

ويوجد بالأسواق معقمات بخارية أخرى أكثر تطوراً قد توصل إلى . مصدر دائم للبخار بدلا من توليد البخار فى الجهاز نفسه .

ويتم التعقيم فى هذا النوع من الأجهزة على ثلاث فترات فى ثلاثة أيام متتالية ، ويعرف التعقيم فى هذه الحالة بالتعقيم المتقطع Fractional sterilization أو Tyndallization . فى اليوم الاول تعرض المواد المراد

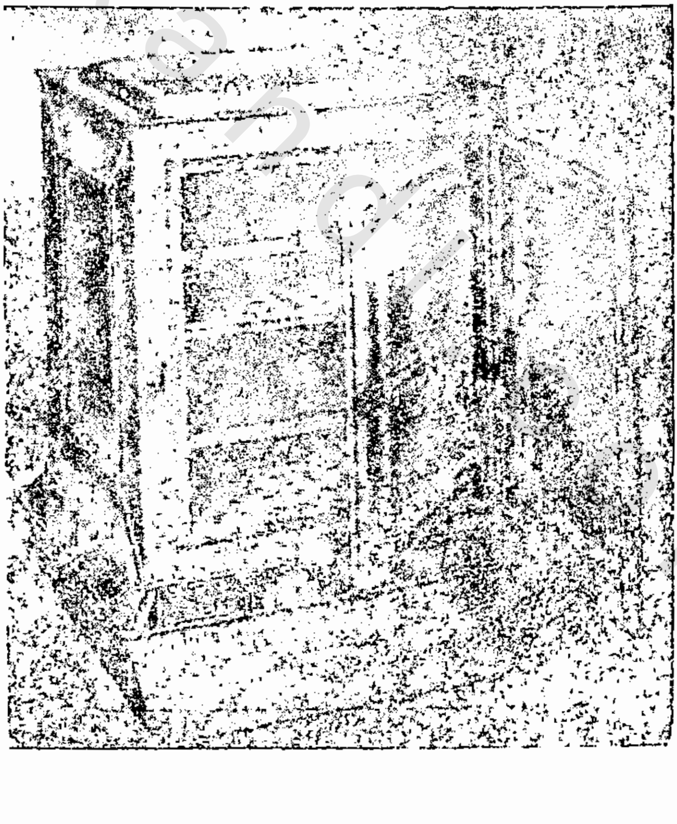
تعقيمها إلى البخار (١٠٠°م) لمدة تتراوح بين ½ - ١ ساعة حسب طبيعة وحجم المادة المراد تعقيمها ثم تترك لتبرد ، وتوضع بالحضان على درجة ٣٠°م أو تترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة . وفى اليوم الثانى والثالث تكرر العمليات السابقة ثم تحفظ البيئات التى تعقم عن هذا الطريق فى يومها الثالث بالحضان على درجة ٣٠م للتأكد من كفاءة التعقيم ، ويمكن التعرف على ذلك بعدم ظهور نموات بكتيرية بالبيئة .

والفكرة الأساسية فى التعقيم المتقطع هو أن الخلايا البكتيرية الخضرية وكذلك بعض الجراثيم الداخلية تهلك عندما تعرض لبخار الماء (١٠٠°م) لمدة ثلاثون دقيقة . أما البعض الآخر من الجراثيم الداخلية فانها تقاوم هذه الحرارة حتى ولو تعرضت إليها لمدة طويلة تصل إلى عدة ساعات ، كذلك فان ترك البيئة بالحضان أو بالغرفة لمدة ٢٤ ساعة يسمح لهذه الجراثيم المقاومة للحرارة بأن تنبت وتتحول إلى خلايا خضرية تهلك خلال فترة التعقيم فى اليوم التالى . وزيادة فى الاحتياط يعطى مايتبقى من جراثيم فرصة أخرى للانبات قبل إجراء فترة التعقيم الثالثة وبذلك نضمن إتمام عملية التعقيم . ويجب أن نلاحظ أنه إذا لم تنبت كل الجراثيم بالبيئة قبل إجراء التعقيم فانه لايمكن الإعتماد على هذه الطريقة كوسيلة للتعقيم ، حيث أن حرارة البخار تحت الضغط الجوى العادى (١٠٠°م) تفشل فى قتل الجراثيم غير النابتة والمقاومة للحرارة ، وقد يرجع السبب فى عدم إنبات الجراثيم أثناء إجراء التعقيم بهذه الطريقة إلى مايأتى

١ - قد تكون البيئة الغذائية المراد تعقيمها غير مناسبة لإنبات الجراثيم فالماء المقطر ومحاليل بعض الأملاح المعدنية لاتعتبر وسطاً مناسباً لإنبات بعض الجراثيم .

٢ - جراثيم البكتريا عبر الهوائية لن تنبت طالما كانت البيئة معرضة إلى ظروف هوائية

وتتبع طريقة التعقيم المتقطع هذه عادة فى تعقيم البيئات التى يدخل فيها الجيلاتين واللبن والسكريات التى يخشى من تحللها إذا ماأستعملت طريقة التعقيم بالبخار تحت ضغط مرتفع حيث تزيد درجة الحرارة فى الحالة الأخيرة عن ١٠٠°م



(شكل ٧) معقم أرنولد

٢ ـ الأوتوكلاف : Autoclave

يستغل بخار الماء أيضاً فى جهاز الأوتوكلاف إلا أن زيادة الضغط بداخل الجهاز تزيد من درجة حرارة التعقيم . فمن المعروف أن الماء يغلى على درجة حرارة ١٠٠ °م تحت الضغط الجوى العادى أما إذا زاد الضغط فوق الماء عن الضغط الجوى فانه يغلى على درجات أكثر ارتفاعاً وجدول ٤ يبين العلاقة بين ضغط البخار ودرجة الحرارة التى يصل إليها .

(جدول ٤)

العلاقة بين زيادة ضغط البخار ودرجة حرارته

ضغط البخار رطل / بوصة مربعة	درجة الحرارة °م
صفر	١٠٠
٥	١٠٧,٧
١٠	١١٥,٥
١٥	١٢١,٦
٢٠	١٢٦,٦
٢٥	١٣٠,٥
٣٠	١٣٤,٤

وجهاز الأوتوكلاف (شكل ٨) فى أبسط صورة عبارة عن اسطوانة معدنية عادة تصنع من الصلب أو من سبائك معدنية قوية تتحمل ضغط قد يصل إلى ٣٠ رطل / بوصة^2 على الأقل ، له غطاء يقفل باحكام بعد أن

يوضع به المواد المراد تعقيمها . وبعد التأكد من إحتواء الجهاز على المـاء إلى الإرتفاع المناسب مع ترك الصنبور (ا) مفتوحاً تشعل مصابيح بنزن (إذا كان الجهاز يعمل بالغاز) أو يوصل التيار الكهربائى (إذا كان تسخينه يتم بالكهرباء) ، أو يدفع به بخار الماء (من مصدر دائم للبخار) . وعندما يشاهد البخار خارجاً بشدة من الصنبور (ا) فان هذا يعنى خلو الجهاز من الهواء وأمتلائه بالبخار . عندئذ يقفل الصنبور (ا) جيداً ويترك البخار ينضغط بداخل الجهاز حتى يصل إلى الضغط المطلوب وهو ١٥ رطل / بوصة٢ ويعرف ذلك بالاستعانة بالمانومتر المتصل بالجهاز . ويمكن تنظيم الضغط بداخل الجهاز بتعديل طول ذراع رافعة تتحكم فى قفل وفتح صمام الامن . وهناك طرقاً أخرى لتنظيم الضغط فى الاجهزة الاكثر تطوراً . وتحت هذا الضغط (١٥ رطل / بوصة٢) تصل درجة حرارة البخار إلى ١٢١.٦ °م وعندما يصل الضغط والحررة إلى هذه الدرجة يحسب وقت التعقيم الذى يختلف باختلاف طبيعة وحجم المواد المراد تعقيمها و الجدول ٥ يبين الوقت اللازم لتعقيم أحجام مختلفة من محاليل مائية أو سوائل معبأة فى أوعية مختلفة الحجم .

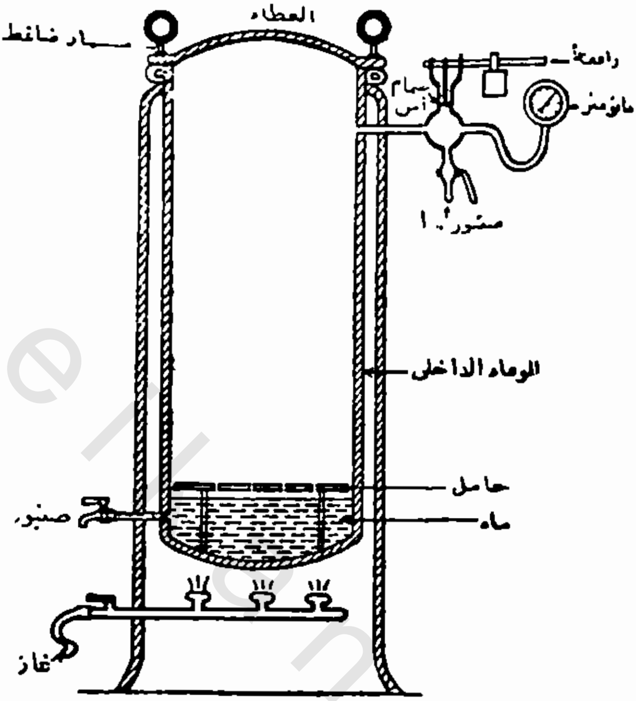
بعد انتهاء مدة التعقيم يوقف مصدر الحرارة فينخفض تدريجيا كل من درجة الحرارة والضغط بداخل الجهاز . ويراعى عدم الاسراع فى خفض الضغط بداخل الجهاز فجأة وذلك بفتح الصنبور (ا) ، حيث أن السوائل تكون عندئذ على درجة أعلى من ١٠٠°م وأن تعرضها فجأة لضغط الجـو العادى يؤدى إلى غليانها بشدة داخل الأوعية وإلى تطاير سداداتها بعيـداً عنها . لذلك يجب أن نسمح بالانخفاض التدريجى للضغط بداخل الجهاز حتى يصبح مساويا للضغط الجوى ويمكن التأكد من ذلك بالاستعانـة بالمانومتر . وبعدها يفتح الصنبور (ا) ثم يفتح غطاء الجهاز وترفع الادوات المعقمة .

(جدول ٥) :

الوقت اللازم لتعريض محاليل مائية أو سوائل بداخل
أوعية مختلفة الحجم ليتم تعقيمها فى جهاز الاوتوكلاف

الوعـــاء	سعة الوعاء	وقت التعريض بالدقائق عند ١٢١ – ١٢٣°م
انابيب اختبار	١٨ × ١٥٠ مم	١٢ – ١٤
انابيب اختبار	٣٢ × ٢٠٠ مم	١٣ – ١٧
انابيب اختبار	٣٨ × ٢٠٠ مم	١٥ – ٢٠
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠ مـل	١٢ – ١٤
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠ مـل	١٢ – ١٥
دوارق مخروطية (بيركس)	٥٠٠ مـل	١٧ – ٢٢
دوارق مخروطية (بيركس)	٢٠٠٠ مـل	٣٠ – ٣٥

وقد تقل كفاءة التعقيم بالاتوكلاف إذا ما أهمل إخراج الهواء من داخل الجهاز قبل قفل الصنبور (ا) حيث أن وجود الهواء مختلطا بالبخار بداخل الجهاز يقلل من درجة حرارة التعقيم فقد وجد أن درجة حرارة مخلوط من البخار والهواء عند ضغط معين تكون أقل بكثير من درجة حرارة البخار بمفرده عند نفس الضغط (جدول ٦) . ولما كانت فاعلية الأوتوكلاف فى التعقيم ترجع إلى الحرارة الرطبة للبخار تحت الضغط وليس إلى الضغط المرتفع بمفرده، لذا فاننا نلمس أهمية إرتفاع الحرارة بداخل هذا الجهاز وأن أى عامل يقلل من الحرارة يعتبر مقللا لكفاءة التعقيم .



(شكل ٨) : قطاع طولى فى الاوتوكلاف

كذلك يجب أن نراعى أهمية وصول البخار إلى المادة المراد تعقيمها فاذا لم يصل البخار إلى المادة فإن عملية التعقيم لاتخرج عن كونها عملية تعقيم حرارى جاف (١٢١°م لمدة عشرون دقيقة) الأمر الذى لا يكفى للتعقيم حتى بالحرارة الجافة كما سبق أن بينا ، ويحدث ذلك عادة إذا قفلت الأوعية بسدادات شديدة الإحكام أو قلت مسامية المواد المراد تعقيمها كالكميات الكبيرة من التربة فان ذلك يعوق وصول البخار إلى داخلها . ويشترط عدم إحكام غلق السدادات وأن تغطى الأوعية بسدادات مسامية من القطن أثناء تعقيمها .

ويستعمل الاوتوكلاف عادة فى تعقيم كثير من البيئات الغذائية السائلة

أو المضاف إليها الآجار آجار ومحاليل السكريات الاحادية ومحاليل الاملاح المختلفة ، وكذلك يستعمل الاوتوكلاف فى تعقيم المزارع القديمة قبل التخلص منها . وكذلك فى تعقيم الملابس والقفازات وأدوات الجراحة .

(جدول ٦) :

العلاقة بين درجة تفريغ الهواء ودرجة الحرارة

داخل الأوتوكلاف عند ضغط بخار ١٥ رطل / بوصة٢

تفريغ الهواء	ضغط البخار رطل / بوصة٢	درجة الحرارة داخل الاوتوكلاف °م
تام	١٥	١٢١
٢/٣	١٥	١١٥
١/٢	١٥	١١٢
١/٣	١٥	١٠٩
صفر	١٥	١٠٠

وهناك بعض المواد لايمكن تعقيمها بالأوتوكلاف مثل المواد التى لاتمتزج بالماء مثل الدهون والزيوت وكذلك المواد التى تتأثر بالحرارة المرتفعة .

وفى بعض الأحيان يمكن إستعمال الأوتوكلاف كمعقم حرارى تحت الضغط الجوى العادى ، وذلك إذا استعمل مع ترك الصمام (ا) مفتوحاً .

وتختلف سعة الأوتوكلافات تبعاً للحاجة إليها فهناك أوتوكلافات كبيرة الحجم تستعمل فى مصانع حفظ الأغذية ، حيث يشترط تعقيم المعلبات

تعقيما تاماً ، وتستعمل آلات رفع كبيرة فى وضع وإخراج الكميات الكبيرة من المعلبات قبل وبعد تعقيمها بداخل الأوتوكلاف فى هذه المصانع .

اختبار كفاءة التعقيم فى الاتوكلاف

تختبر الكفاءة التعقيمية للأتوكلاف بالتأكيد من أن درجة الحرارة المبينة على الترمومتر وقيمة الضغط التى يبينها المانومتر هى قيما حقيقية للحرارة والضغط بداخل الجهاز ، إذ أحيانا ماتختلف القراءات التى تظهرها هـذه المقاييس عن الواقع بداخل الأتوكلاف لعطل قد يصيبها وفى هذه الحالة لايكون التعقيم سليما ، ولمنع مثل هذه الأخطاء يلحق بالأوتوكلافات الكبيرة الحجم وخاصة تلك المستعملة فى مصانع الحفظ والمستشفيات ، ثيرموجراف يتصل ذراعة بالترمومترات الداخلية للتأكد من انتظام الحرارة ولتسجيل ماقد يطرأ على درجة الحرارة من اختلاف أثناء فترة التعقيم .

ويمكن التأكد من كفاءة التعقيم بجهاز الأوتوكلاف بطريقة حيويـــة ، بأن توضع كمية من القطن أو قصاصات من ورق الترشيح بعد تشبيعها بمعلق من جراثيم بعض البكتيرات المحبة للحرارة Thermophilic والتى تتحمل جراثيمها درجات حرارة مرتفعة مثل *Bacillus stearothermophilus* فى أظرف من الورق ، وتوضع فى مكان مناسب بالأوتوكلاف أثناء التعقيم وبعد انتهاء عملية التعقيم ، يؤخذ جزء من القطن أو إحدى قصاصات ورق الترشيح ويغمر فى بيئة زرع معقمة ومناسبة ويحضن على درجة ٥٥م لمدة ٢٤ ساعة ، فاذا تكون نمو واضح بالبيئة بعد فترة التحضين دل ذلك على عدم كفاءة التعقيم ، (من المعروف أن درجة الحرارة المهلكة لجراثيم هذه البكتيريا هى ١٢١° م عندما تعرض لها لمدة ١٢ دقيقة) .

ويمكن أيضاً استعمال طرق كيماوية لاختبار كفاءة التعقيم بالأتوكلاف وذلك بوضع كمية صغيرة من أحد المواد الكيماوية ذات درجة إنصهار تشابه درجة حرارة التعقيم فى الاوتوكلاف ، (مثل الكبريت ودرجة انصهاره ١١٥°م أو Succinic anhydride ودرجة انصهاره ١٢٠°م) فى أنابيب شعرية فى الأوتوكلاف أثناء إجراء التعقيم ، فاذا انصهرت هذه المواد دل ذلك على كفاءة التعقيم ووصول درجة الحرارة فى الأوتوكلاف أثناء التعقيم إلى درجة لاتقل عن درجة انصهار المادة المستعملة . ومن عيوب هذه الطريقة أنها لاتبين مدى استمرار الحرارة المرتفعة داخل الأوتوكلاف فقد تهبط درجة حرارة الأوتوكلاف عقب إنصهار المادة .

ثانيا ــ الاشعاعات : Radiations

يستفاد عملياً من التأثير الضار لبعض الإشعاعات على خلايا البكتيريا فى تعقيم الأماكن كغرف العمليات الجراحية وعنابر تعبئة الأدوية والعقاقير المعقمة أو فى غرف التلقيح الملحقة عادة بالمعامل البكتيريولوجية الكبيرة ، وفى بعض الصناعات الغذائية أو صناعات الألبان أو فى تعقيم السطوح الكبيرة الملوثة فى محطات الحجر الزراعى لتطهير المنتجات الزراعية مما يكون عالقا بها من كائنات ممرضة يخشى انتقالها من مكان إلى آخر ، كما يمكن تعقيم أطباق بترى أو الماصات المصنوعة من البلاستيك بواسطة الأشعة فوق البنفسجية بعد تغليفها فى أكياس من مادة البولى اثيلين وذلك خوفا من استعمال الحرارة فى تعقيمها .

١ ــ الأشعة فوق البنفسجية : Ultravoilet radiation

عادة تستعمل هذه الأشعة أكثر من غيرها فى أغراض التعقيم وفى الأغراض السابق ذكرها ويمكن الحصول عليها من صمامات خاصة يمكنها

أن تشع تركيزات مرتفعة من هذه الأشعة والتى يتراوح طول موجاتهــا من ٢٦٠ إلى ٢٧٠ nm وهو النطاق الفعال فى إبادة الأحياء الدقيقة. ويلاحظ أن للأشعة فوق البنفسجية قدرة ضعيفة على التغلغل داخل الأشياء ، من ذلك نرى أن فعلها التعقيمى يكون غالبا سطحيا ، كما أن طبقة رقيقة من الزجاج قد تحجز نسبة كبيرة منها لذلك يتجنب تعقيم المواد فى الأوعية الزجاجية ، وقد يعزى التأثير المميت للأشعة فوق البنفسجية إلى تكوين فوق أكاسيد Peroxides فى الوسط المعامل وهذه تعمل كعامل مؤكسد ، أو نتيجة لتأثيرها على DNA الخلية .

٢ – الإشعاعات الأخرى :

يمكن استعمال الأشعة السينية X - rays ذات الموجات القصيرة التى تعرف أيضا باسم Roentgen rays ، وكذلك أشعة جاما ذات الموجات التى يتراوح طولها بين ٠,٠٠٥ و ١ nm فى أغراض التعقيم وهذه الإشعاعات لها قدرة عالية على اختراق الأجسام الصلبة والتغلغل فيها ، ولازال استعمال الأشعة السينية فى هذا الصدد من الأمور غير العملية وذلك لتطلبها أجهزة خاصة ولزيادة تكاليفها . ونظراً لما لأشعة جاما من القدرة العاليــة على الاختراق فيقتصر استعمالها فى التعقيم الداخلى للأجسام الصلبة السميكة فقط .

الطرق الكيميائية Chemical methods

يمكن استعمال بعض المواد الكيماوية فى أغراض التعقيم وذلك لفعلهــا المميت أو الموقف لنمو خلايا الأحياء الدقيقة . وفيما يلى بعض المواد الكيماوية التى تستعمل فى صورة محاليل للتعقيم السطحى للمواد التى لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية .

كحول الإيثيل Ethyl alcohol : يستعمل عادة كحول الإيثايل بتركيز يتراوح بين ٥٠ - ٧٠ ٪ فى تطهير الأيدى أو المناطق المختلفة فى جسم الإنسان ، والسبب الأساسى للتأثير السام للكحول هو أنه يعمل على تجفيف الخلايا Dehydration حيث يسحب الماء منها ، علاوة على قدرته على تجميع وتخثير Coagulation البروتين الخلوى عندما ينفذ إلى داخل الخلايا ، وكلا التأثيرين يؤديان إلى موت الخلية ، Bactericidal action . ويقال أن قلة الكفاءة التعقيمية للتركيزات الكحولية التى تزيد عن ٧٠ ٪ وكذلك الكحول المطلق ١٠٠ ٪ ، قد ترجع إلى زيادة فعلها التجفيفى على حساب القدرة التخثيرية للكحول بمعنى أن كمية الماء المزالة من الخلايا تكون كبيرة بدرجة تعوق دخول الكحول إلى الخلايا ، لذلك يكون تأثير التركيزات المرتفعة من الكحول تأثيراً مجففا فقط وهذا يتسبب عنه ايقاف لنمو الخلايا Bacteriostatic action .

ومما هو جدير بالذكر انه ليس للكحول بجميع تركيزاته أى تأثير ضار على الجراثيم الداخلية .

الفينول أو حمض الكربوليك (Carbolic acid or phenol) : يستعمل محلول هذه المادة بتركيزات تتراوح بين ٢ - ٥ ٪ للتعقيم السطحى لأرضيات الغرف والعيادات والمعامل وكذلك فى تعقيم أسطح المناضد التى تجرى عليها عمليات العزل والتنمية لمزارع الكائنات الدقيقة وبعض الأدوات والأجهزة . وتقتل التركيزات المستعملة (٢ - ٥٪) من الفينول خلايا الكائنات الحية الدقيقة نتيجة لتجميعها وتخثيرها للبروتين الخلوى بمعنى أنها ذات تأثير مميت .

كلوريد الزئبقيك (Mercuric chloride $HgCl_2$) : يستعمل محلول كلوريد الزئبقيك والذى يطلق عليه أيضا السليمانى بتركيز ٠,١ ٪ فى أغراض التعقيم السطحى لكثير من الأشياء مثل تعقيم أسطح المناضد وغيرها كما يستعمل هذا المحلول فى التعقيم السطحى للأجزاء النباتية المصابة بأمراض نباتية توطئة لعزل الطفيل المسبب من أنسجة النبات الداخلية فى حالة نقية . ويرجع الفعل السام لهذا المحلول إلى ارتباط أيونات الزئبق بمجاميع السلفاهيدريل Sulfhydryl group (SH —) فى البروتين الأنزيمى فيتوقف نتيجة لذلك نشاط هذه الأنزيمات حيث أن نشاط كثير من الإنزيمات يعتمد على وجود هذه المجميع بصورة حرة. أما إذا زاد تركيز كلوريد الزئبقيق فان ذلك يؤدى إلى تجميع وتخثير البروتين الخلوى علاوة على ارتباطه بالمجاميع الفعالة السالفة الذكر .

أكسيد الإثيلين (Ethylene Oxide) : بعض المواد التى تستعمل فى تحضير بيئات الزرع تكون حساسة للتعقيم بالطرق الحرارية . فمثل هذه المواد يمكن أن تعقم بطريقة كيماوية . والمادة التى تستعمل فى التعقيم الكيميائى يجب أن تكون متطايرة Volatile وكذلك سامة للكائنات الحية الدقيقة . وبذلك يمكن إزالتها من المادة المراد تعقيمها بعد المعاملة وأهم مادة استعملت هى أكسيد الإثيلين وهى مادة سائلة تغلى على ١٠,٧°م يمكن أن تضاف إلى المحاليل فى صورة سائلة (التركيز النهائى يصل إلى ٠,٥—١ ٪) على درجة حرارة من صفر — ٤°م . أو تستعمل فى صورة غازية على حرارة أعلى من درجة غليانها . وهى غير ثابته كيماويا فتتحلل فى المحاليل المائية إلى جليكول الإثيلين Ethylene glycol وهو غير متطاير وقد يكون له تأثيرات غير مرغوبة ويلاحظ أن أكسيد الإثيلين قابل للانفجار وسام للانسان ولذلك

يجب أن تتبع إحتياطات خاصة فى استعماله.ولهذهالأسبابلايستعملكوسيلة روتينية فى المعامل ولكن يستعمل فى الصناعة فى تعقيم أطباق بترى المصنوعة من البلاستيك أو أى مواد أخرى من البلاستيك والتى قد تنصهر على درجات حرارة أعلى من ١٠٠°م .

الطرق الميكانيكية Mechanical methods

تعتمد هذه الطرق على إزالة خلايا الكائنات الحية الدقيقة من الوسط الكامنة فيه بطريقة ميكانيكية كأن تحجز الثقوب الدقيقة للمرشحات المستعملة خلايا الكائنات الحية ذات الإقطار التى تزيد عن أقطار ثقوبها .

الترشيح Filtration

يستعمل لذلك مرشحات بكتيرية يتراوح قطر ثقوبها بين أقل من ميكرون واحد إلى عدة ميكرونات . ويراعى أن التعقيم بالترشيح لايتوقف فقط على قطر الثقوب ، بل يتوقف أيضا على الشحنة الكهربائية للمرشح وكذلك الشحنة الكهربائية للكائنات الدقيقة المحتوى عليها السائل ، وكذلك على طبيعة ذلك السائل المراد ترشيحه . وعادة يسحب السائل خلال المرشح باحداث ضغط سالب (تفريغ) على الجانب الآخر من المرشح حيث تستخدم مضخة تفريغ مائية أو كهربائية . وقد يستعمل فى بعض الحالات ضغط موجب وذلك بالضغط فوق سطح السائل نفسه لدفعه خلال ثقوب المرشح وهناك عديد من المرشحات تختلف فى نوع المادة التى يصنع منها المرشح وهى كما يلى :

١ ــ مرشح شمبرلاند : Chamberland filter ، وهو مصنوع من نوع معين من الخزف أو الصينى .

٢ – مرشح بيركفيلد : Bekefeld filter ، وهو مصنوع من الطين الدياتومى Diatomaceous earth

٣ – مرشح عجينة باريس : Plaster of paris filter ، وهو مصنوع من عجينة باريس وهو نوع من الجبس يتكون من كبريتات كالسيوم مع كربونات كالسيوم وأكسيد مغنيسيوم .

٤ – مرشح زايتس : Seitz filter ، والمرشح عبارة عن أقراص مختلفة الحجم من مادة الأسبستس .

٥ – مرشح الزجاج المسامى : Sintered glass filter: ، والمرشح مصنوع من الزجاج المسامى .

٦ – المرشحات الغشائيةأوالجزيئية : Membrane filter or molecular filter

ومن أمثلتها مايعرف Milipore filters ، والذى يتكون من أغشية رقيقة مصنوعة من استرات السيليولوز .

وعادة تستعمل طريقة الترشيح فى تعقيم محاليل كثير من المواد الكيماويه التى لايمكن تعقيمها عن طريق الحرارة الرطبة بنوعيها ، حيث أن الحرارة المرتفعة تغير من الخواص الكيميائية والفيريائية لهذه المواد ، ومن أمثلة ذلك التحضيرات الإنزيمية أو محاليل المضادات الحيوية أو السموم التى تفرز فى المزارع أثناء نمو بعض البكتريات . لدلك فان مثل هذه المواد تعقم بالترشيح بدلا من الحرارة المرتفعة ولما كانت حبيبات الفيروس يمكنها أن تمر خلال ثقوب هذه المرشحات لذلك فهى تستخدم فى عزل الفيروسات أو البكتيريوفاج عن الخلايا البكتيرية أو من بقايا تحللها .

والمرشحات الخزفية أو الدياتومية أو الزجاجية أو المصنوعة من أقراص

الأسبستس ، وهى عبارة عن سليكات معدنية ، تحمل شحنات كهربائية سالبة . فعندما ترشح حبيبات تحمل شحنات موجبة خلال هذه المرشحات فانها تجذب إلى أيونات السليكا ذات الشحنة المضادة وتبقى مثبتة ومدمصة على المرشح،وهذ امايحدث كثيرا عند ترشيح الفيروسات والبكتيريوفاج خلال مرشح زايتس ذو الأقراص الأسبستية . ولكن يلاحظ أنه إذا زاد تركيز الحبيبات أو جزيئات الفيروس فى المحلول بدرجة تفوق مايلزم منها للتفاعل مع أيونات السليكات فانه يمكن للكمية الزائدة أن تمر خلال ثقوب المرشح . كما يلاحظ أيضا أن التجاذب أو الادمصاص بين جزيئات المادة المرشحة وأيونات السليكا يكون تجاذبا مؤقتا يمكن الرجوع فيه حيث أن إمرار الماء خلال مثل هذا المرشح يؤدى إلى إنفصال الجزيئات المدمصة ومرورها خلال الثقوب . أما المرشحات المصنعة من عجينة باريس فانها على العكس تحمل شحنات موجبة فهى بذلك لاتعوقترشيح الجزيئات ذات الشحنات الموجبة، من ذلك يتضح أنه يمكننا أن ننتقىالمرشح المناسب حسب طبيعة الشحنات التى تحملها جزيئات المادة المراد ،ترشيحها وسوف نتناول فيما يلى وصفاً مختصراً لبعض المرشحات الشائعة الاستعمال .

١ — مرشح زايتس : Seitz filter

يعتمد هذا المرشح على أقراص من خليط من الأسبستس والسليلوزذات أقطار مختلفة وسمك يتراوح بين ٢—٣مم ● يوضع بين شطرى الجهاز (شكل٩)

● وأقراص الأسبستس يمكن الحصول عليها من عدد من الشركات والبعض منها ينتج للاستعمال تحت ظروف معينة فمثلا الاقراص التى تنتجها شركة Ford's - Sterimatus لهـا درجات مختلفة يميزها الرموز التالية :

G S = General sterilizing

G S /pH = Liquids sensitive to alkalinity.

S B = Sterilizing liquids containing smallest micro - organisms.

أما تلك التى تنتجها شركةJohn Carsonفهى من نوع واحد وتستعمل تحت مختلف الظروف.

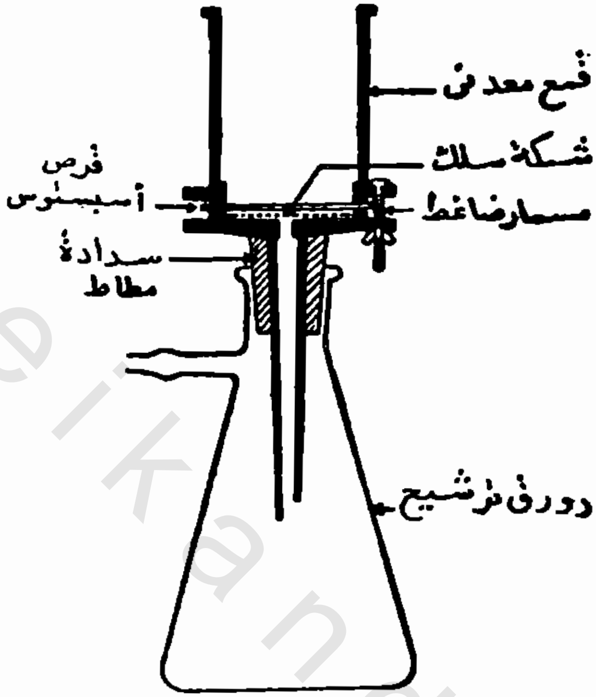
EKS — for general sterile filtration.

والذى يشبه القمع إلى حد ما وتثبت بواسطة مسامير برمية ضاغطة ، وقمة الجهاز عبارة عن قمع صغير يوضع به المحلول المراد ترشيحه . وعادة يثبت الجهاز فى قمة دورق مخروطى خاص بالتفريغ يوصل إلى مضخة التفريغ ، ليساعد عملية الترشيح ، ويراعى ضرورة تعقيم الجهاز قبل أستعماله وذلك بوضعه كاملا فى الأتوكلاف بعد تغليفه بالورق وتغطية الفتحة الجانبية للدورق بسدادة من القطن لتمنع تكثيف البخار بداخله وكذلك لتمنع التلوث بعد التعقيم . ويراعى أن يترك الجهاز بعد تعقيمه ليبرد ثم يستعمل الترشيح. ويجمع المحلول المعقم (الراشح) فى الدورق المخروطى ويمكن بعد ذلك نقله بواسطة ماصة معقمة إلى أوعية أخرى معقمة . ويلاحظ ضرورة إستعمال قرص جديد من الأسبستس عند كل عملية ترشيح مع مراعاة تعقيم الجهاز فى كل مرة .

٢ — مرشحات الزجاج المسامى: Sintered glass filters or Fritted glass filters

تعتمد هذه المرشحات على طبقة من الزجاج المسامى يثبت فى أقماع زجاجية والطبقة المسامية المستخدمة تجهز من مسحوق ناعم من زجاج معين يسخن إلى درجة عالية من الحرارة لاتسمح بانصهار الزجاج ولكن تسمح بتماسك المسحوق وتحوله إلى طبقة متصلة ، بمعنى أن تتحد حبيبات المسحوق دون أن ينصهر الزجاج وبذلك تترك الحبيبات بينها مساما دقيقة يمكن أستعمالها فى الترشيح . (شكل ١٠) . ويراعى عند الاستعمال أن يثبت القمع عن طريق سدادة مطاط فوق دورق ترشيح مخروطى من زجاج سميك له فتحة جانبية لتوصلها إلى مضخة التفريغ .

وهناك خمس درجات من هذه المرشحات تبعا لقطر ثقوبها ويشار لكل



(شكل٩): قطاع طولى فى مرشح زايتس.

منها برقم خاص لتميزه عن الأنواع الأخرى والنوع رقم ٥ (Grade 5) ذو مسام أضيق قطراً من الأنواع الأخرى لذلك فهى تستعمل كثيراً فى الأغراض البكتريولوجية .

وعادة تنظف هذه المرشحات بمعاملتها بحمض الكبريتيك المركز المضاف إليه نترات الصوديوم حيث أن هذا الحامض القوى يؤكسد ويذيب المواد العضوية التى تكون عالقة على سطح أو داخل مسام المرشح والتى يمكن بعدئذ التخلص منها ومن آثار الحمض بالغسيل بالماء الجارى .

٣ـ المرشحات الغشائية أو المرشحات الجزيئية : Membrane or Molecular filter

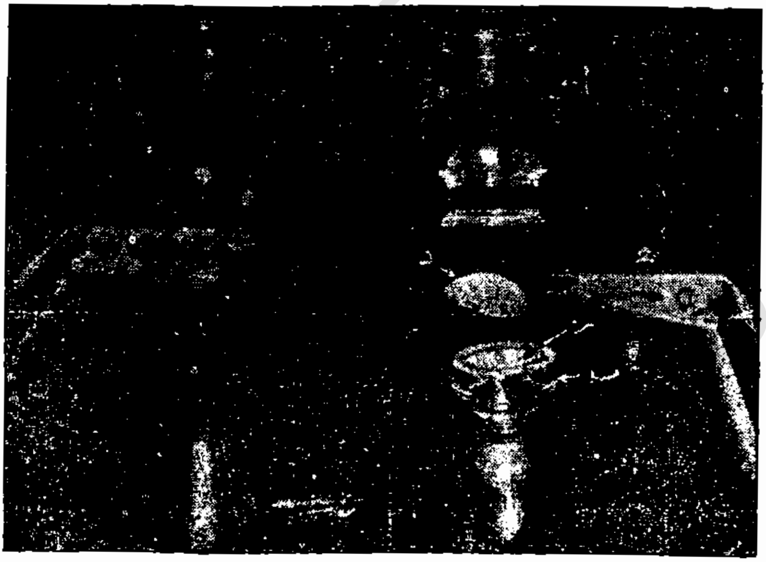
عادة تفوق هذه المرشحات غيرها وذلك لسهولة إستعمالها والتخلص من

(شكل ١٠): مرشح الزجاج المسامى

الأغشية المستعملة فى الترشيح بعد إتمامه فلا يحتاج الجهازلعمليات غسيل متكررة ، كما توجد من الأغشية درجات مختلفة من المسامية يمكن أستعمالها وتتميز أيضا بعدم أدمصاص المواد المرادترشيحها على جزيئات المرشح . ومن أشهر هذه المرشحات وأكثرها أستعمالا المرشحات التى تعرف بالمليبور Millipore filters . والمرشح أى الغشاء المستعمل فى الترشيح عبارة عن غشاء رقيق مسامى مصنوع من مادة نقية خاملة من الناحية البيولوجية هـــى استرات السليولوز Cellulose esters أو بعض المواد المشابهة لها .

ويوجد من هذه الأغشية أنواع مختلفة تصل إلى ٢٠ نوع تختلف تبعـــا لسعة ثقوبها التى تتراوح بين ٠١,٠ — ٤ ميكرون . ويتراوح قطر القرص ، المستعمل من ١٣م — ٢٩٣م . وعادة تتماثل أقطار الثقوب الخاصة بالقرص الواحد فمثلا فى النوع HA type فان متوسط قطر الثقوب به ٤٥,±٠٢,٠ ميكرون والمجموعة MF type يوجد منها ١٢ نوع مختلف يتراوح قطر ثقوبها بين ٠١,٠ ـ ٨ ميكرون ويصل سمك القرص إلى ١٣٥ ± ١٠ ميكرون ومنها النوع GS type الذى يستعمل كثيراً فى أغراض التعقيم والدراسات البكتيريولوجية ومتوسط قطر ثقوبه ٢٢,±٠٢,٠ ميكرون وله معامل أنكسار يصل إلى ١,٥١ (يشبه معامل أنكسار الزجاج أو زيت السيدر) ويمكن تعقيمه بالأتوكلاف بحيث لاتزيد الحرارة عن ١٢٥°م . وعادة توضع الأغشية أو الأقراص فى جهاز خاص Millipore filter holder (شكل ١١) ويراعى تثبيته أيضاً فى دورق مخروطى زجاجى يوصل إلى مضخة التفريغ .

وللغشاء إستعمالات أخرى ميكروسكوبية علاوة على إستعمالاته في التقدير الكمي للبكتيريا في الماء أو في بعض المواد الأخرى فبعد القيام بالترشيح يؤخذ الغشاء ويعامل بزيت السيدر Cedar wood oil حيث تمتليء ثقوبه بالزيت ويصبح شفافاً وبذلك يمكن فحص الحبيبات التي تكون عالقة على سطحـــه ميكروسكوبياً باستعمال العدسة الزيتية . وفي حالة التقدير الكمي للبكتيريا بالماء مثلا ، يرشح حجم معين من الماء المراد فحصه خلال الغشاء فتسكن محتوياته من الخلايا البكتيرية على سطح الغشاء . ينزع الغشاء بعدئذ ويوضع على سطح ورقة ترشيح مشبعة ببيئة غذائية مناسبة في طبق بتري معقم . ويوضع بالحضان لفترة ٢٤ ساعة تظهر بعدها مستعمرات البكتيريا فوق المرشح حيث يمكن بعد ذلك تقدير عددها كمياً .



(شكل ١١) : Milliproe filter ا — قمع زجاجي ، ب — قاعدة زجاجية . حـ — قرص زجاجي مسامي يستند عليه المرشح الغشائي (د) — هـ — ماسك زنبركي .

اختبار كفاءة طرق التعقيم

١ — إستعمل جهاز الأوتوكلاف فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى (١٥ رطل / بوصة ٢ لمدة ١٥ دقيقة) .

٢ — إستعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة) .

٣ — إستعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة) مرتين فى يومين متتاليين .

٤ — إستعمل جهاز أرنولد فى تعقيم أربع أنابيب مرق مغذى أخرى (١٠٠°م لمدة ساعة) ثلاث مرات فى ثلاثة أيام متوالية .

٥ — رشح كمية من المرق المغذى باستعمال مرشح زايتس ثم أنقل البيئة المرشحة إلى أنابيب ذات سدادات قطنية سبق تعقيمها وهى فارغة فى جهاز الأوتوكلاف .

٦ — ضع الأنابيب جميعاً بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ثم إفحصها .

(تعكير البيئة يدل على عدم كفاءة طريقة التعقيم المستعملة)

٣

عزل البكتريا فى مـزارع نقيـة

ISOLATION OF PURE CULTURES

المزرعة النقية pure culture هى التى تحتوى على خلايا نوع واحد one species فقط من الكائنات الحية الدقيقة. وعلى العكس فان المزرعة المختلطة Mixed culture هى التى تحتوى على نوعين أو أكثر من الكائنات الحيـــة الدقيقة . وعادة لاتوجد البكتريا فى مزارع نقيه فى بيئاتها الطبيعية ، إنما توجد باستمرار فى مزارع مختلطة . والمزارع النقية تحضر عادة بالمعمل ، لدراسة أنشطة وخواص خلايا النوع البكتيرى الواحد ، وذلك يتطلب وجودها نقية غير مختلطة بأنواع أخرى .

هناك عديد من الطرق لحصول على المزارع النقية وذلك بعزل خليـــة واحدة فردية Single cell isolation من المجموع المختلط ، ويجرى ذلك عادة بالإستعانة بالميكروسكوب المجهز بأجهزة خاصة تعرف بالميكرومانيو بلاتور Micromanipulators .وهى الطريقة المثلى لضمان الحصول عـــلى مزرعة نقية ، كما أن هناك طرق ميكروسكوبية أخرى لاتعتمد على أجهزة خاصة لعزل الخلايا الفردية من البكتريا سيرد ذكرها فيما بعد .

وعادة يتبع لحصول على مزرعة نقية طرقا سهلة يتم فيها الزرع عـــــلى البيئات الصلبة حيث أن ذلك يتيح الفرصة لخلايا الأنواع البكتيرية المختلفة والموجودة فى صور مختلطة ، أن تنمو على سطح الآجار متباعدة عن بعضها بدرجة تسمح لأن ينتج عن نمو كل خلية مفردة ، مستعمرة فردية ingle colony تختلف فى الشكل عن الأنواع الأخرى . وتتبع الطرق الآتية لحصول على مزرعة نقية عن طريق عزل مستعمرة فردية Single colony isolation.

أولا – طريقة التخطيط على سطح الآجار المتصلب : Streak - Plate Method

١ – إصهر أنبوبتين من الآجار المغذى فى ماء يغلى .

٢ – عقم سطح المنضدة باستعمال قطعة قطن مبللة بمحلول السليمانى ١,٠٪ أو فينول ٥٪ .

٣ – أترك الآجار ليبرد حتى حوالى ٥٠°م .

٤ – إرفع السدادة القطن من إحدى أنبوبتين ثم عقم فوهة الأنبوبة فى اللهب لعدة ثوانى .

٥ – إرفع غطاء طبق بترى من أحد الجوانب لأقل فتحة تسمح بادخال فوهة الأنبوبة ، ثم صب البيئة المسالة فى الطبق (شكل ١٢) ، (يلاحظ وضع وضع الطبق بقرب حافة المنضدة حتى تكون الفتحة أقل مايمكن) .

٦ – بنفس الطريقة ، صب الطبق الثانى ، ويجب مراعاة الاهتمام والدقة فى صب البيئة من الأنبوبة إلى الطبق لتجنب التلوث الخارجى .

٧ – تترك الأطباق حتى يتصلب الآجار . (يفضل إستعمال أطباق سبق صبها وتركها فى الحضان لمدة ٢٤ ساعة ، حتى يجف سطح الآجار ، لإمكان الحصول على مستعمرات فردية ، وكما يمكن بعدها أستبعاد الأطباق التى قد يظهر بها تلوث) .

٨ – عقم إبرة التلقيح (شكل ١٣) ، ثم دعها تبرد لمدة حوالى ٥ ثوانى ثم إرفع السدادة القطنية من المزرعة المختلطة المراد تنقيتها وذلك بمسكها بواسطة الإصبع الصغير لليد اليمنى (شكل ١٤) ، وعقم فوهة الأنبوبة أنقل ملء عقدة Loopful من المزرعة بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة ، ثم عقم مرة أخرى الفوهة وضع السدادة .

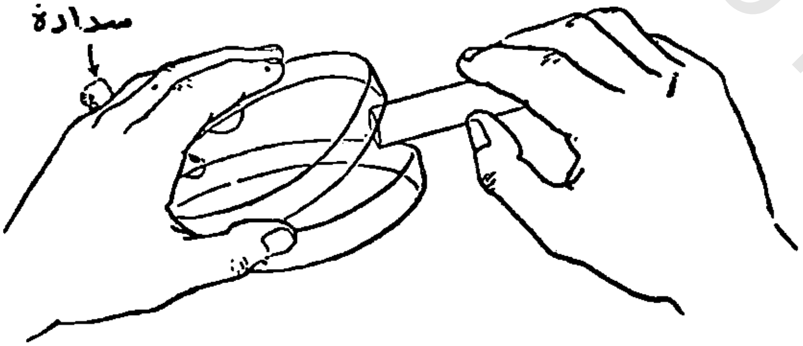
obeikandl.com

٩ — أرفع غطاء طبق بترى لدرجة تسمح بادخال الابرة ثم أنشر اللقاح على سطح الآجار المتصلب ، ويلاحظ أنه توجد عدة طرق لنشر اللقاح على سطح الآجار المتصلب (شكل ١٥)، والغرض منها جميعاً إجراء التخفيف المناسب وبذلك فانه فى نهاية التخطيط سوف يكون التخفيف كاف لنمو مستعمرات فردية .

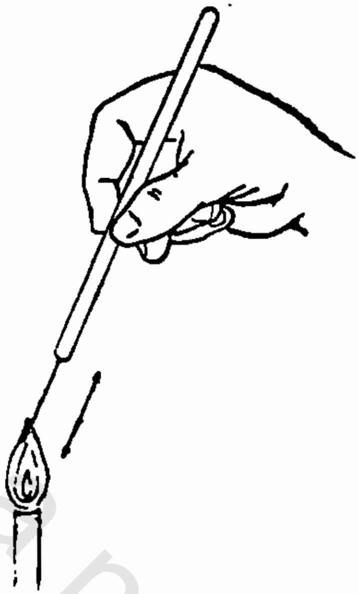
١٠— يمكن تلقيح الطبق الآخر بنفس الإبرة ، بدون تعقيمها وذلك فى حالة اتباع طريقة التخطيط البسيط ، للتأكد من الحصول على مستعمرات فردية متباعدة . و(شكل ١٦) يبين الطرق المختلفة فى تخطيط سطح الآجار.

١١— علم الأطباق بالكتابة عليها ، إما بالحبر الشينى أو بقلم شمع ، أو بوضع ورق لصق ويكتب عليه بالقلم الرصاص . وتوضع الأطباق فى الحضان على درجة الحرارة الملائمة .

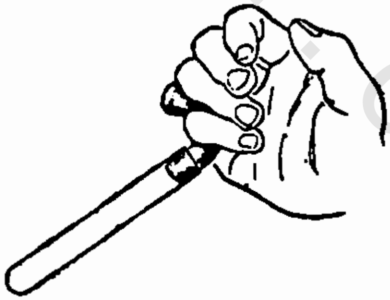
١٢— تظهر المستعمرات على سطح الآجار (يمكن دراسة شكل المستعمرات كما سيوضح فيما بعد) ، ويمكن الحصول على مزرعة نقية بنقل جزء من نمو مستعمرة فردية بواسطة إبرة التلقيح إلى البيئة المناسبة والتى إما أن تكون فى صورة آجار عميق Deep agar أو آجار مائل Slant agar أو فى صوره بيئة سائلة Liquid medium .



(شكل ١٢) : طريقة صب بيئة الآجار فى طبق بترى .

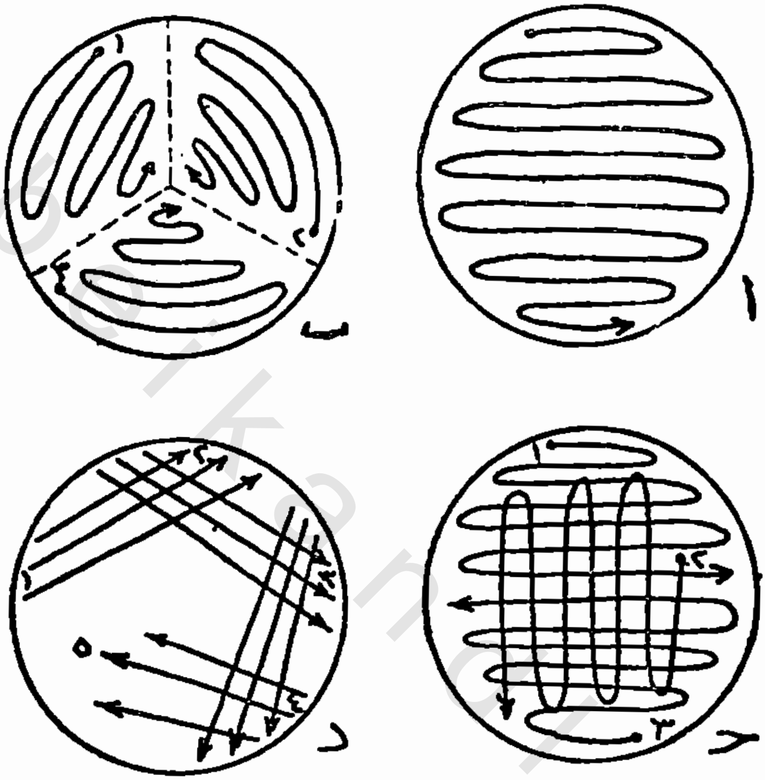


(شكل ١٣) : تعقيم ابرة التلقيح .



(شكل ١٤) : طريقة رفع السدادة القطنية .

obeikandl.com



(شكل ١٥) : الطرق المتبعة فى تخطيط سطح الآجار .

(ا) التخطيط البسيط .

(ب) ابدأ التخطيط من «١» ثم من «٢» ثم من «٣» .

(جـ) ابدأ التخطيط عند «١» حتى تصل إلى منتصف الطبق . عقم الأبرة ثم ابدأ التخطيط من «٢» ثم عقم الأبرة ثم ابدأ التخطيط المرة الثانية من «٣» .

(د) التخطيط المتعامد : خطط عدة خطوط فى الاتجاه من ١ — ٢ ثم عقم الابرة ثم خطط فى الاتجاه ٢ — ٣ ثم تكرر هذه العملية من ٣ — ٤ ومن ٤ — ٥ .

يلاحظ أنه فى الخطوط الأخيرة ستظهر المستعمرات الفردية .

obeikandi.com

تلقيح الآجار العميق والآجار المائل :

(ا) تلقيح الآجار العميق :

١ — عقم سلك إبرة التلقيح المستقيمة (شكل ١٦) حتى درجة الإحمرار ثم أتركها قليلا لتبرد .

٢ — إلمس المستعمرة المراد نقل جزء منها إلى الآجار العميق .

٣ — إرفع السدادة القطنية من أنبوبة الآجار العميق المراد تلقيحها (تمسكها بالأصبع الصغير لليد اليمنى) ، عقم فوهة الأنبوبة .

٤ — أوخز السلك المستقيم المحتوى على اللقاح حتى قاع الأنبوبة ، ثم أسحب السلك بعناية ، عقم فوهة الأنبوبة فى اللهب مرة ثانية ، ثم ضع سدادة القطن مكانها .

٥ — عقم سلك إبرة التلقيح قبل أن تضعها على المنضدة .

٦ — أكتب البيانات على الأنبوبة الملقحة ، وضعها فى الحضان .

٧ — بعد فترة التحضين المناسبة ، سيظهر نمو بكتيرى على سطح أو بداخل البيئة (يمكن دراسة شكله كما سنبين فيما بعد) .

(ب) تلقيح الآجار المائل :

١ — عقم سلك إبرة التلقيح ذات العقدة (شكل ١٦) فى اللهب . دع الإبرة تبرد .

٢ — إلمس المستعمرة الفردية المراد نقل جزء منها إلى سطح الآجار المائل .

٣ — أرفع سدادة القطن من أنبوبة الآجار المائل المراد تلقيحها وذلك باستعمال الأصبع الصغير لليد اليمنى (شكل ١٤) ، عقم الفوهة فى اللهب .

obeikandl.com

٤ — أنشر اللقاح Inoculum على سطح الآجار المائل فى خط مستقيم من أسفل إلى أعلى ثم عقم الفوهة وضع السدادة .

٥ — عقم إبرة التلقيح قبل وضعها على المنضدة ه

٦ — أكتب البيانات على الأنبوبة الملقحة ، وضعها فى الحضان .

٧ — بعد إنتهاء مدة التحضين المناسبة ، سيظهر نمو بكتيرى فى البيئة (يمكن دراسة شكله كما سنبين فيما بعد) .

ملحوظة : يمكن أيضاً تلقيح البيئة السائلة المعبأة فى أنابيب الاختبار ،

(شكل ٢٦) : أ — ابرة التلقيح المستقيمة
ب — ابرة التلقيح ذات العقدة.

وذلك باتباع نفس الطريقة السابقة بإستثناء أن سلك إبرة التلقيح المستقيم أو ذو العقدة المحتوى على اللقاح يغمس فى البيئة السائلة وبعد إنتهاء فترة التحضين المناسبة ، سيظهر نمو بكتيرى فى البيئة (سيدرس شكله فيما بعد) .

ثانيا — طريقة الأطباق المصبوبة : Pour plate method

١ — إصهر ٣ أنابيب من الآجار المغذى .

٢ — عقم سطح المنضدة باستعمال قطعة مبللة بمحلول السليمانى ١ر٠٪ أو فينول ٥٪ .

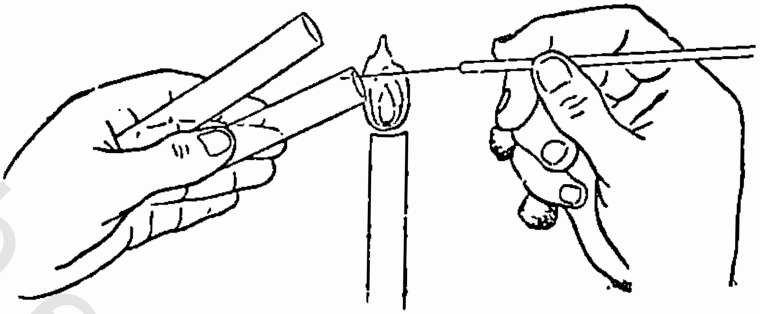
٣ – أترك الآجار ليبرد حتى حوالى ٤٥°م .

٤ – عقم سلك إبرة التلقيح ذات العقدة فى اللهب ، أتركها تبرد . أنزع سدادة القطن من المزرعة المختلطة بمسكها بواسطة الأصبع الصغير لليد اليمنى ، ثم عقم فوهة الانبوبة فى اللهب . أنقل ملء عقدة من المزرعة بواسطة إبرة التلقيح ، ثم عقم فوهة الانبوبة مرة أخرى ثم ضع السدادة . إنزع سدادة القطن من أحد الانابيب التى بها آجار منصهر ومبرد إلى حوالى ٤٥°م (لاحظ أن إرتفاع درجة الحرارة عن هذا الحد يعرض البكتيريا للموت) ، عقم الفوهة ثم لقح الآجار بها وذلك بغمس سلك الابرة فى البيئة ثم سحبها . عقم الفوهة وضع السدادة ، عقم سلك إبرة التلقيح قبل وضعها على المنضدة . حرك أنبوبة الآجار وهو لازال سائلا بين راحتى اليد لخلط المحتويات جيداً وتوزيع اللقاح . حاذر أن تصل البيئة إلى السدادة . يمكن للتسهيل أن يلقح الآجار بمسك ، الأنبوبتين (أنبوبة الآجار والمزرعة التى سيأخذ منها اللقاح) فى نفس اليد (شكل ١٧) .

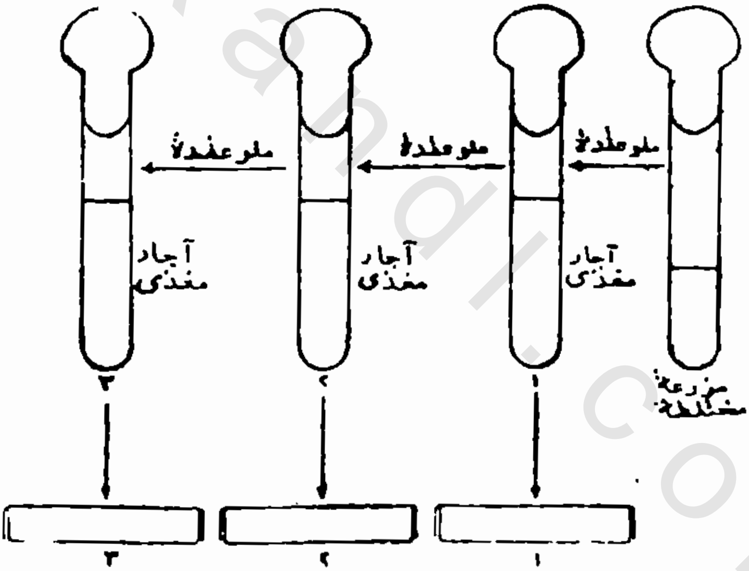
٥ – بنفس الطريقة السابقة ينقل ملء عقدة من اللقاح من الانبوبة ١ إلى ٢ وكذلك من الانبوبة ٢ إلى ٣ (شكل ١٨) .

٦ – صب محتويات كل أنبوبة فى طبق بترى معقم ، وتترك الاطباق حتى يتصلب الآجار ، ثم حضن الاطباق وهى مقلوبة بالحضان على درجة الحرارة المناسبة بعد كتابة البيانات عليها .

٧ – بعد فترة التحضين سيظهر النمو بشكل مستعمرات ، ويلاحظ أنه فى هذه الطريقة تكون بعض المستعمرات مدفونة فى الآجار فى حين أن البعض الآخر يظهر على سطح الآجار . ويلاحظ أن الطبق الأول يحتوى على عدد كبير من المستعمرات ، وبذلك لن تظهر به مستعمرات منعزلة عن بعضها بل



(شكل ١٧) : طريقة نقل اللقاح . لاحظ كيفية مسك ابرة التلقيح باليداليمنى والانبوبتين باليد اليسرى .



(شكل ١٨) رسم تخطيطى يبين كيفية الحصول على مستعمرات فردية بطريقة الاطباق المصبوبة .

تظهر المستعمرات متزاحمة على سطحه . أما الطبق الثانى أو الثالث فتظهر به بعض المستعمرات المفردة ، وبذلك يمكن الحصول على مزرعة نقية وذلك بنقل جزء من مستعمرة فردية إلى بيئة مناسبة كما وضحنا سابقاً . ويلاحظ أنه

obeikandl.com

يوجد أختلاف فى شكل المستعمرات السطحية للأنواع البكتيرية المختلفة ، أما المستعمرات المدفونة فى الآجار فعادة تكون صغيرة وعدسية الشكل ، يصعب التميز بين الأنواع البكتيرية المختلفة عن طريقها .

وقد لوحظ أن البكتيريات التى تنتج مستعمرات مخاطية Mucoid يكون من الصعب فصلها عن غير المخاطية Nonmucoid بطريقة التخطيط ، ولكن يسهل فصلها بطريقة الاطباق المصبوبة نظراًنلإ نفصالها يكون أفضل عند رج الآجار المنصهر عنه فى حالة التخطيط .

طرق الاحتفاظ بالمزارع النقية

Maintenance and preservation of pure cultures

عند دراسة طرق الحصول على المزارع البكتيرية النقية يلزم عادة معرفة كيفية الاحتفاظ بها وهى على حالتها من النقاوة والنشاط لفترات مختلفة من الزمن . فى معظم معامل البكتيريولوجيا يحتفظ بعدد كبير من المزارع النقية للبكتيريات المختلفة والتى تعرف باسم مجموعة المزارع الأصلية stock culture collection وتستخدم هذه المزارع فى أغراض التدريس والبحث أو كمزارع قياسية لاختبارات معينة .

وفيما يلى بعض الطرق المستعملة فى حفظ المزارع :

١ — النقل على فترات فى بيئات جديدة periodic transfer to fresh media

يمكن الاحتفاظ بالمزارع البكتيرية النقية بنقلها على آجار مائل جديد ومعقم ،لهنفس تركيب البيئة الأصلية على فترات منتظمة . ويتم هذا النقل على فترات تختلف مدتها تبعاً لنوع البكتيريا . فكثير من مزارع البكتيريات غير ذاتية التغذية يمكن الاحتفاظ بحيويتها لفترة تتراوح بين عدة أسابيع إلى عدة شهور إذا ماتركت نامية على بيئة الآجار المغذى فى حين أن هناك بعض

البكتيريات وبخاصة الممرضة يشترط للاحتفاظ بها حية وذات قدرة علـــلى إحداث المرض للعائل أن تجدد مزارعها خلال مدة تتراوح بين أسبوع إلى أسبوعين .

من ذلك نرى أنه إذا أتبعت هذه الطريقة لحفظ المزارع البكتيرية يجب أن يراعى : (ا) نوع البيئة الغذائية المستعملة لكل نوع بكتيرى. (ب) درجة حرارة التخزين . (ج) الفترات التى تجدد عليها المزارع .

٢ ــ طريقة الحفظ تحت طبقة من الزيت المعدنى :

Preservation by overlaying cultures with mineral oil

يمكن الاحتفاظ بالمزارع النقية لكثير من البكتيريا لفترات طويلة إذا غمر سطح النمو بكمية كافية من زيت معدنى (زيت البرافين المعقم) . ويشترط أن يغطى الزيت كل السطح المائل من الآجار وللتأكد من ذلك تضاف كمية من الزيت ليصل مستواه إلى حوالى نصف بوصة فوق قمة الآجار المائل .

وتختلف حيوية البكتيريا المحفوظة بهذه الطريقة تبعا لنوعها . ولكن يمكن الاحتفاظ بالمزارع التى تعامل بهذه الطريقة لمدة تصل إلى عدة سنوات. وتتميز هذه الطريقة بامكان أخذ جزء من النمو المغمور فى الزيت بواسطة إبرة التلقيح وتجديد نموها مع الاحتفاظ بالمزرعة الأصلية .

٣ ــ حفظ المزارع فى جو مفرغ عقب تجفيفها السريع وهى فى حالة تجميد :

Preservation of cultures by rapid drying in a frozen state

وتعرف هذه الطريقة أيضاً باسم الليوفيليزيه Lyophilization وهى من أكفأ الطرق فى حفظ المزارع البكتيرية لفترات طويلة تصل إلى عشرين سنة أو أكثر وفى هذه الطريقة تجفف الخلايا بسرعة فائقة وهى مجمدة تبعاً

للخطوات التالية : يوضع معلق الخلايا فى أنابيب صغيرة مسحوبة القمة ثم تغمر فى مزيج من الثلج الجاف dry ice والكحول حتى تصل درجة حرارتها إلى — ٨٧٥م ثم توصل فوهة الأنبوبة الصغيرة إلى جهاز التفريغ وبعد التأكد من حدوث التفريغ والجفاف تغلق الأنبوبة باحكام وذلك بتعريض عنقها إلى لهب الأكسجين والأنبوبة لازالت تحت ظروف التفريغ .

obeikandl.com

الصفـــات المـــزرعيـــة

CULTURAL CHARACTERISTICS

تعتبر الصفات المزرعية من أهم الصفات التى يشترط دراستها لغرض تصنيف وتقسيم البكتيريات المختلفة وتشمل هذه الدراسة وصفاً دقيقاً للنمو البكتيرى على البيئات الصلبة والسائلة وبالأخص وصفا مفصلا للمستعمرات الفردية .

أولا ــ وصف المستعمرات الفردية النامية على سطوح البيئات الصلبة :

١ ــ **شكل المستعمرة** Form : تتخذ المستعمرة الفردية لكائن بكتيرى معين شكلا من الاشكال الآتية (شكل ١٩) عندما ينمى على بيئة صلبة .

(شكل ١٩) : الا شكال المختلفة للمستعمرات البكتيرية .

(ا) نقطية Punctiform ، مستعمرات صغيرة جداً ولكنها تشاهد بالعين المجردة ، قطر المستعمرة أقل من ١ مم .

(ب) دائرية circular

(ج) خيطية Filamentous

(د) غير منتظمة Irregular

(هـ) جذرية Rhizoid ، نمو متفرع يشبه تفرعات الجذور .

(و) مغزلية Spindle ، المستعمرة سميكة فى الوسط عنها فى الأطراف.

obeikandi.com

٢ — ارتفاع المستعمرة Elevation (شكل ٢٠) :

(شكل ٢٠) الاشكال المختلفة لارتفاع المستعمرات البكتيرية

(ا) مسطحة أو منبسطة Flat

(ب) مرتفعة Raised

(ج) محدبة Convex

(د) كثيرة التحدب pulvinate

(ه) مرتفعة الوسط Umb onate

٣ — شكل حافة المستعمرة Margin or edge (شكل ٢١) :

(شكل ٢١) : الاشكال المختلفة لحواف المستعمرات

(ا) كاملة Entire (ب) مموجة Undulate

(ج) مفصصة Lobate (د) مسننة Erose

(ه) خيطيـة Filamentous (و) مجعدة Curled

٤ — سطح المستعمرة Surface

(ا) ناعم Smooth (ب) خشن Rough

(ج) حلقات مختلفة الاقطار ومتحدة المركز Concentrically ringed

(د) مقسمة قطريا Radiately ridged

obeikandi.com

٥ ــ الصفات الضوئية للمستعمرة : Optical features

(ا) معتمة Opaque ، لاتسمح للضوء بالمرور خلالها .

(ب) نصف شفافة Translucent ، تسمح للضوء بالمرور خلالها بدون أن تسمح بالرؤية الكاملة للأشياء خلفها .

(ج) نصف شفاف لامع Opalescent

٦ ــ قوام المستعمرة Consistency ويمكن أيضاً وصف قوام النمو فى حالة المزارع النامية على الآجار المائل باستعمال نفس الصفات .

(ا) زبدى Butyrous ، مثل قوام الزبد .

(ب) لزج Viscid ، النمو يعلق بإبرة التلقيح عند ملامسته .

(ج) غشائى Membranous ، نمو رفيع متصل مثل الغشاء .

(د) هش Brittle ، نمو جاف يتكسر عندما تلامسه إبرة التلقيح

ثانيا ــ وصف النمو على الآجار المائل : Agar Streak (Slant) growth

١ ــ كمية النمو Amount of growth

(ا) ضئيل Scanty (ب) متوسط Moderate

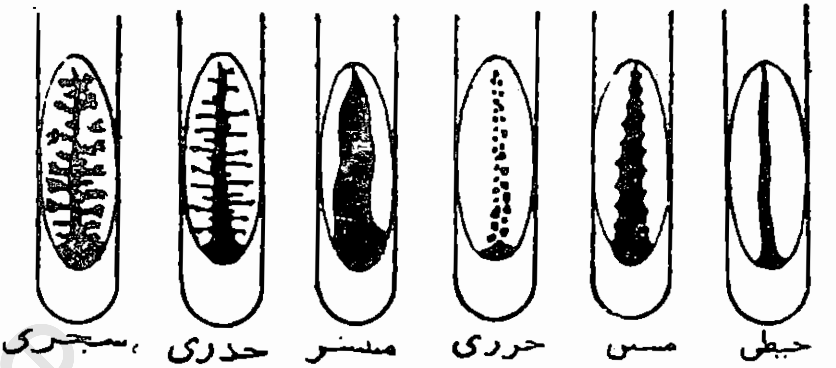
(ج) غزير Abundant

٢ ــ شكل النمو : Form(شكل ٢٢)

(ا) خيطى Filiform ، نمو متماثل على جانبي خط التلقيح .

(ب) مسنن Echinulate ، النمو حول خط التلقيح له حواف مسننة أو مدببة .

obeikandi.com



(شكل ٢٢) : أشكال النمو المختلفة على الآجار المائل .

(جـ) خرزى Beaded ، مستعمرات عديدة منفصلة أو شبه متصلة على طول خط التلقيح .

(د) منتشر Spreading ، النمو يزداد بدرجة واضحة بعيداً عن خط التلقيح .

(هـ) جذرى Rhizoid ، متفرع يشبه تفرع الجذر .

(و) شجرى Arborescent ، يشبه تفرع الشجرة .

٣ — إنتاج الصبغة : Pigmentation

من الصفات المزرعية الهامة المستغلة فى أغراض التصنيف إنتاج الصبغات Pigmentation أو إنتاج اللون Chromogenesis فمن الأنواع البكتيرية ماينتج صبغة تبقى فى داخل الخلية يتكون عنها نمو بكتيرى ملون (مثل البكتيريا *Sarcina lutea* ذات اللون الأصفر الليمونى) . فى حين أن بعض الأنواع الأخرى تفرز صبغة خارجية تلون البيئة (مثل البكتيريات التابعة للجنس *Pseudomonas*) .

ويلاحظ أن كثافة الصبغة تتأثر بتركيب البيئة فمثلا قد لاتتكون الصبغة

obeikandl.com

إلا فى وجود أحماض أمينية معينة مثل الاحماض الامينية الحلقية ، وكذلك فى وجود أو غياب سكريات معينة ، علاوة على تأثير درجة pH البيئة ، وظروف التحضين فى إنتاج هذه الاصباغ :

٤ — الرائحة : Odor

(ا) النمو ليس له رائحة .

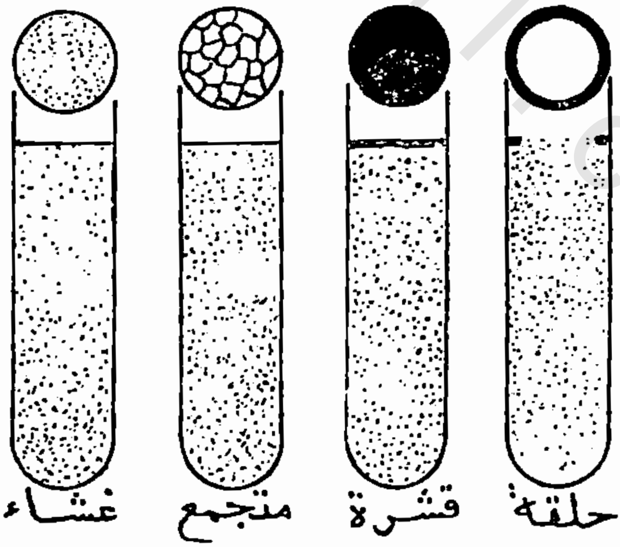
(ب) إذا وجدت رائحة يذكر مدى تشابهها للروائح المعتادة والمعروفة بأن يقال أنها تشبه ....

ثالثا : النمو فى بيئة المرق المغذى : Growth in Nutrient Broth

١ — النمو السطحى : Surface (شكل ٢٣) .

(ا) لايوجد نمو سطحى .

(ب) النمو حلقة محيطة بالسطح Ring



(شكل ٢٣) : أشكال النمو على سطح البيئات السائلة .

obeikandi.com

(ﺟ) نمو بشكل قشرة رقيقة تغطى السطح Pellicle

(د) نمو سطحي متجمع Flocculent كتل نمو بكتيرى ملتصق ببعض، لها أشكال مختلفة تطفو على سطح المزرعة السائلة .

(ﻫ) نمو غشائى سميك Membranous

٢ – النمو تحت السطح : Subsurface

(ا) لايوجد (ب) عكر Turbid

(ﺟ) حبيبي Granular يتكون من حبيبات صغيرة

٣ – النمو المترسب: Sediment

(ا) لايوجد (ب) راسب حبيبي Granular

(ﺟ) راسب متكتل Flocculent (د) راسب لزج Viscid

(ﻫ) راسب قشرى Flaky .راسب فى شكل عديد من القشور الرقيقة المنفصلة .

كمية النمو :

فى كل من حالات النمو السابقة توصف كميته كما يلى :

(ا) قليل Scanty (ب) متوسط Moderate

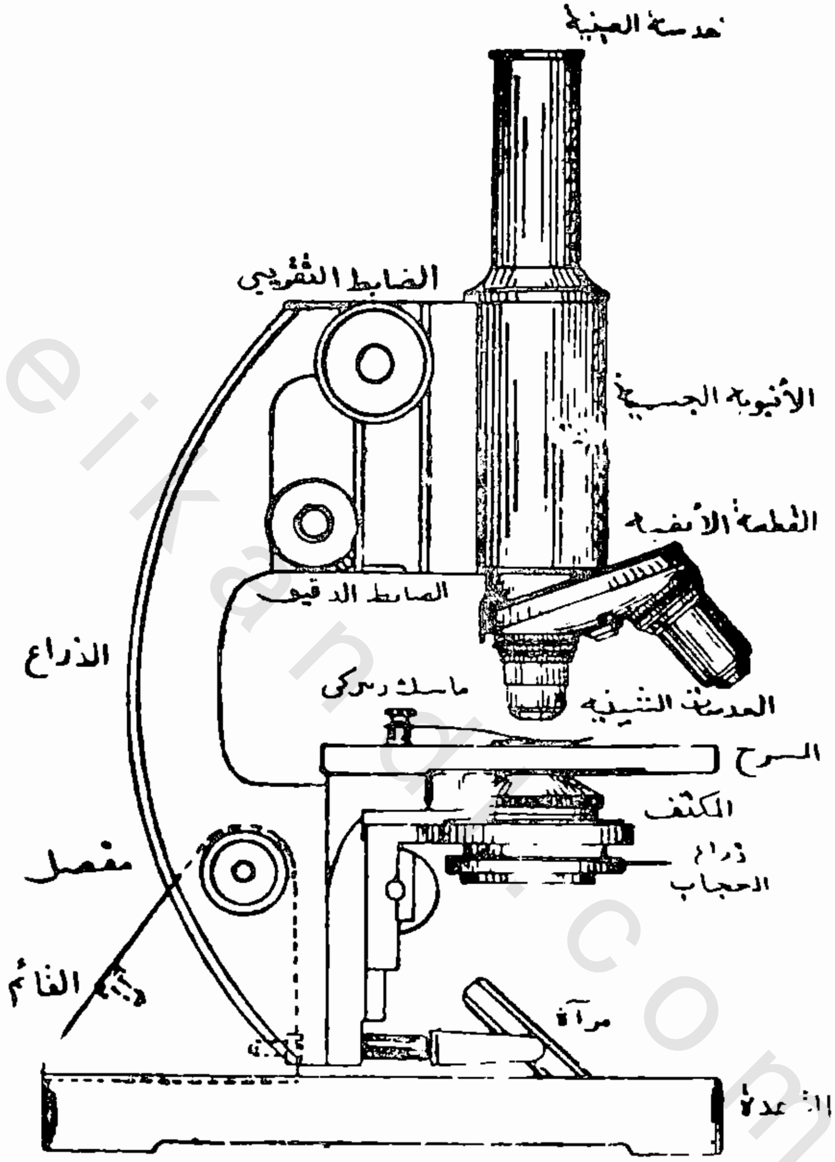
(ﺟ) غزير Abundant

obeikandi.com

الميكروسكوب المركب
COMPOUND MICROSCOPE

لما كانت الخلايا البكتيرية لا يمكن مشاهدتها بالعين المجردة فهى يجب أن تكبر بدرجة تكفى لرؤيتها ودراستها ، لذلك كان إستعمال الميكروسكوب المركب فى دراسة الشكل الظاهرى للبكتيريا،أمراً هاماً وضرورياً نظراً لأنه الجهاز الضوئى الذى يستعمل لتكبير الاشياء الدقيقة . ويتكون الميكروسكوب المركب (شكل ٢٤) من الاجزاء الرئيسية الآتية :

العينية Eye-piece ،والتى تثبت فى الطرف العلوى فى أنبوب السحب Draw tube ، وهى عبارة عن عدسة مركبة (مكونة من عدستين أو أكثر) . والجزء الأسفل من الأنبوبة مجهز بقطعة أنفية دوارة Revolving nose-piece ، تثبت فيها الشيئيات Objectives ، وتتحرك الانبوبة بما تحمله من عينيه والشيئيات لأعلى ولأسفل بواسطة عجلة الضبط التقريبى Coarse adjustment knob لغرض البوأرة التقريبية فى حين أن الحركة اللازمة للبوأرة الدقيقة Accurate focussing تتم بواسطة عجلة الضبط الدقيق Fine adjustment knob الانبوبة وعجلات الضبط والذراع Arm تحمل على العمود أو القائم pillar المتصل بالقدم أو القاعدة Foot or Base بواسطة مفصل Inclination-joint يساعد على تحريك الذراع إلى الإمام أو الخلف إلى وضع يلائم الفاحص. ويتصل بالعمود أو القائم قريباً من المفصل لوحة تسمى بالمسرح Stage لها فتحة مستديرة الشكل فى مركزها ليمر فيها الضوء . توضع الشريحة المراد فحصها على المسرح وتثبت بمواسك زنبركية Spring clips ، ويوجد تحت فتحة المسرح المستديرة مكثف Condenser ،يتصل بأسفله حجاب قزحى Iris diaphragm يعمل على تحديد سعة زاوية مخروط الضوء الذى ينفذ من المكثف إلى



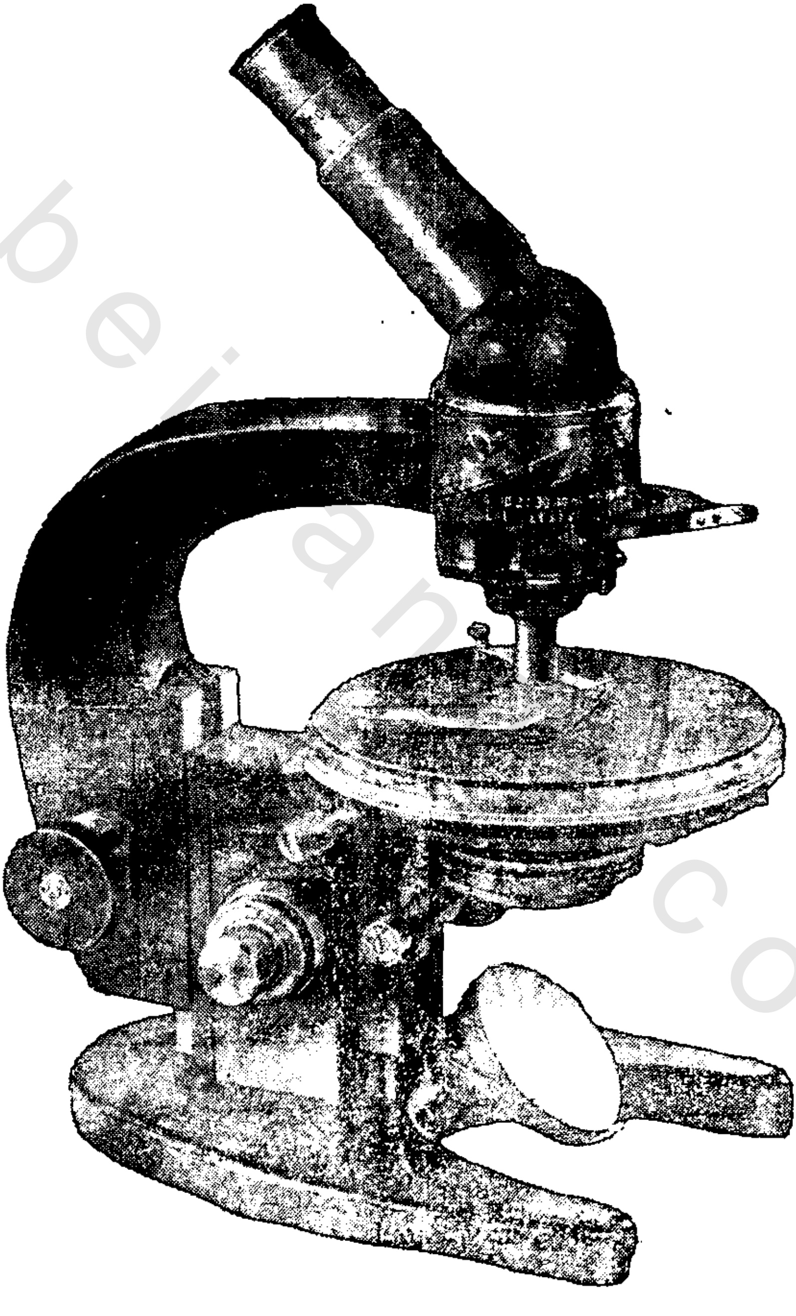
obeikandl.com

(شكل ٢٤ — ١)

١ — الميكروسكوب المركب

ب — ميكروسكوب مركب أحدث — لا حظ ميل الا نبوب

ووجود عجلات الضبط قرب القاعدة .

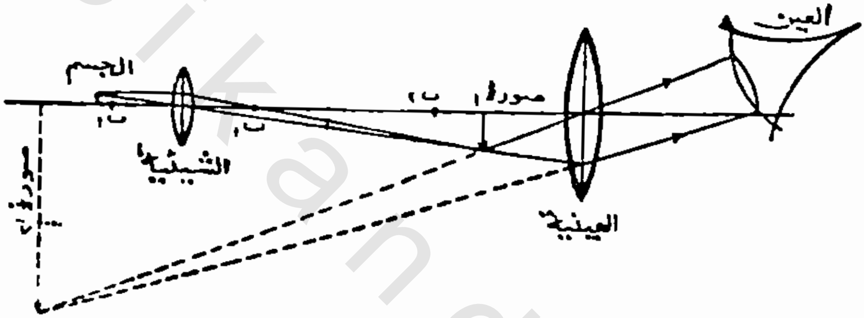


(شكل ٢٤ – ب) :

obeikandl.com

الشيئية . والمكثف والحجاب يمكن تحريكهما إلى أسفل أو إلى أعلى حسب الحاجة بواسطة عجلة ضبط خاصة . وفى قاعدة الميكروسكوب الضوئى توجد مرآة Mirror يمكن تحريكها فى جميع الإتجاهات وهى ذات وجهين أحدهما مسطح والآخر مقعر ومثبتة تحت المكثف على العامود أو الحامل الرئيسى .

ويبين شكل ٢٥ مسار الضوء خلال الميكرسكوب المركب .



(شكل ٢٥) : مسار الضوء خلال الميكروسكوب المركب
ب ١ — بؤرة العدسة الشيئية .
ب ٢ — بؤرة العدسة العينية .

ومن الملاحظ أنه عند تمام ضبط الميكروسكوب يكون الجسم على بعد أكثر قليلا من البعد البؤرى (ب ١) للشيئية المستعملة فتتكون للجسم صورة مكبرة حقيقية مقلوبة تعرف بالصورة الوسطية أو الأولية Intermediate or primary (الصورة١) والتى تقع على مسافة من العينية أقل من بعدها البؤرى وذلك فى حالة الفحص البصرى ، وبذلك تراها عين الفاحص كصورة تقديرية مكبرة ومعتدلة[(معتدلة بالنسبة للصورة (١) ومقلوبة بالنسبة للجسم (الصورة ٢)] ويوجد طرازاً حديثاً من الميكروسكوب الضوئى المركب ، أدخلت عليه بعض تعديلات تساعد على سهولة العمل ودقته مثل ميل الانبوب

obeikandi.com

إلى ناحية الفاحص ووجود عجلات الضبط قرب القاعدة فى متناول اليدين أو أن تزود بمسرح آلى Mechanical stage يمكن تحريكه فى أربع أتجاهات مختلفة ومزوداً بتدريج يمكن بواسطته تحديد مكان أجزاء معينة من التحضير تسهل إعادة الفحص .

التكبير Magnification

هو العلاقة بين طول أى جزء من الصورة وطول الجزء المماثل له فى الجسم المرئى عندما تكون الصورة والجسم فى أقرب نقطة لوضوح الرؤية لعين الإنسان . الانبوبة بغالبية الميكروسكوبات تكون ذات طول قياسى هو ١٦٠ مم إلا أنه فى بعض الميكروسكوبات يمكن زيادة طول الأنبوبة عن القيمة المذكورة لغرض زيادة التكبير وتعرف هذه الميكرسكوبات باشتمالها على أنبوبة للسحب Draw tube والتكبير النهائى للميكرسكوب كما هو معروف هو حاصل ضرب تكبير الشيئية فى تكبير العينية المستعملتين معا إذا ماثبت طول الانبوبة الميكرسكوبية ويلاحظ أنه فى بعض الميكرسكوبات قد تكون الأنبوبة قطعة واحدة ثابتة أو قد يكون بداخلها أنبوب آخر هو أنبوب السحب يمكن سحبه لأعلى وبتحريكه يمكن تغيير المسافة بين العينية والشيئية فاذا زاد طول الانبوبة عن ١٦٠ مم حتى يصل إلى ٢٠٠ مم مثلا فإن قوة تكبير الشيئية تزداد بمعدل $\frac{٤٠}{١٦٠}$ أى أنها تزيد إلى $\frac{1}{4}$ ١ مرة عما كانت عليه وبالتالى يزداد التكبير الكلى للميكروسكوب .

ويرمز إلى عدد مرات تكبير العدسة للجسم المرئى بعلامة (×) ولكل شيئية أو عينية قوة تكبير خاصة بها تكون مرقومة على سطحها الخارجى بجانب العلامة المذكورة وتتراوح قوة تكبير الشيئيات بين ٢,٥× و ١٠٠ ×وفى ، العينيات بين ٤ × و ٣٥ × .

ويلاحظ أنه يمكن زيادة درجة التكبير Degree of magnification باستعمال عينيات أو شيئيات متزايدة القوة أو كما سبق ذكره بزيادة طول الأنبوبة . وبالرغم من أن قوة التكبير للميكروسكوب تزداد بهذه الطريقة إلا أن درجة التفصيل (قوة التميز) التى يمكن مشاهدتها لاتتغير حيث أنهاتتحدد بطول موجة الضوء المستعمل والعدسة الشيئية المستعملة .

طول الموجة الضوئية :

تختلف أطوال الموجات الضوئية المكونة للمجال الضوئى المرئى وهـو المجال المستعمل فى الميكروسكوب الضوئى والتى تتراوح بين ٤٠٠٠ أ(Å)و ٧٠٠٠ أ(Å)؛ (Å) — أنجستروم Angstrom = ١٠٫-٧ مم) •

أما عند استعمال موجات يقل طولها عن ذلك فتستعمل ميكروسكوبات أخرى مثل ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية Ultra-violet microcope والذى يستعمل الموجات فوق البنفسجية التى يتراوح طولها بين ٣٠٠٠ و و ١٠٠٠ (Å). وميكروسكوب أشعة X - ray microscope والذى يستعمل أشعة × التى يتراوح طولها بين١٠٠ و ١٠(Å)والميكروسكوب الأكترونى Electron - microscope والذى يستعمل الأشعة الألكترونية (١،. Å أوأقل من ذلك).وفى الحالات الأخيرة (حيث يستعمل ضوء غير مرئى) تلتقط صورة الجزء المفحوص على لوح حساس بحمض وتطبع الصورة المتكونة عليه بعد تكبيرها تكبيراً مناسباً .

---

o الانجستروم = ١٠$^{-٧}$ من المليمتر .

المليمتر = ١٠$^{-٣}$. كروميتر μm (ميكرون μ)

μأو μm = ١٠^{٣} نانوميتر nm

obeikandl.com

الشيئيات وقوة التفصيل (قوة التمييز)

الشيئية عبارة عن عدسة مركبة (عدستين أو أكثر) وهى الجزء الاساسى من الميكروسكوب وتتلخص وظائفها فى الآتى :

١ — تستقبل الأشعة الضوئية الآتية من أى نقطه من العينة المفحوصة وتكون لها صورة كما سبق أن وضحنا .

٢ — التكبير

وقد يتعجب الطالب لماذا لا تصمم ميكروسكوبات ضوئية ذات قوى تكبيرية أكبر مما يشاهده فى المعمل ؟ والسبب فى ذلك أن المشكلة ليست فى قوة التكبير بل فى قوة التفصيل (قوة التمييز) Resolving power الخاصة بالشيئية أو بمعنى آخر قدرة الشيئية على أن تكون صوراً منفصلة عن بعضها لنقط أو أجزاء متقاربة من بعضها بشكل صور منفصلة غير متراكبة فوق بعضها وهذه الخاصية تحدد التفاصيل البنائية التى يمكن مشاهدتها ميكروسكوبياً .

وقوة التفصيل (قوة التمييز) هذه تتحدد بطول الموجة الصوتية (λ) المستعملة وقيمة الفتحة العددية Numerical aperture (N. A.) للشيئية وهذه العلاقة يمكن التعبير عنها بالمعادلة الآتية :

$$\text{قوة التفصيل (قوة التمييز)} = \frac{\text{طول الموجة الضوئية}}{\text{٢} \times \text{الفتحة العددية}}$$

$$\text{Resolving power} = \frac{\lambda}{2 \times NA}$$

obeikandl.com

وتقدر الفتحة العددية NA للعدسة بالمعادلة الآتية :

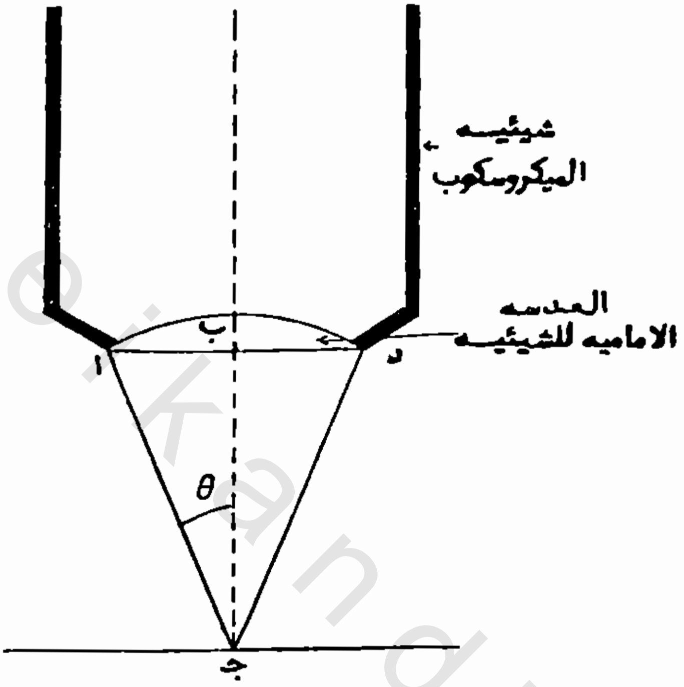
الفتحة العددية = ن جا θ

$$NA = n \sin \theta$$

حيث n أو ن = معامل انكسار الوسط بين الجسم والشيئية (١,٠ فى حالة الهواء و ٥ , ١ فى حالة زيت السيدر (Cedar - wood oil (وجا θ أو Sin θ = جيب (جا) نصف زاوية مخروط الضوء التى تملأ مقدمة الشيئية Angle of aperture وهى الزاوية أ جـ د (شكل ٢٦) والمتكونة بواسطة أقصى شعاعين من الضوء واللذان يبدآن من النقطة جـ والتى تصل إلى عين الفاحص .

(جا θ = $\frac{\text{اب}}{\text{أجـ}}$) .

ويلاحظ أن قيمة الفتحة العددية NA لشيئية الميكروسكوب تعتبر محدودة فان أقصى قيمة للفتحة العددية للشيئيات الجافة أقل من ١ وللشيئيات المغموسة فى الزيت تكون أكثر من الوحدة (١,٢ — ١,٤) ومما هو جدير بالذكر فان الطول الموجى للضوء المرئى المستعمل فى الميكروسكوب الضوئى محدود أيضاً فهى تتراوح بين ٤٠٠٠أ(Å) و٧٠٠٠أ(Å) وبذلك يظهر أن قوة التفصيل (قوة التمييز) للميكروسكوب الضوئى محدودة نتيجة لأن قيم الفتحة العددية للشيئيات وطول الموجة الضوئية للضوء المنظور أو المرئى هى قيم محدودة . وعلى ذلك فانه يلزم لرؤية الأجسام الدقيقة الحجم منفصلة بعضها عن بعض إستعمال أقل طول موجة ضوئية من الضوء المنظور وشيئية لها



(شكل ٢٦) : مخروط الاشعة الخارجة من الجسم ـ والتى تملأ مقدمة الشيئية .

أقصى فتحة عددية ممكنة . فمثلا الشيئية المغموسة فى الزيت لها فتحة عددية قيمتها ١,٢٥ وأن الضوء الأخضر ـ الذى تكون العين أكثر حساسية له ـ له طول موجة ٥٠٠٠ (A°) أو ٥٠٠ nm .

وبتطبيق هذه القيم فى معادلة حساب قوة التفصيل (التميز) :

$$\text{قوة التفصيل (قوة التميز)} = \frac{٥٠٠}{٢ \times ١,٢٥} = ٢٠٠ \text{ nm}.$$

أو = ٢ , ميكــروميتر .
أو = ٢٠٠٠ أنجستروم .

من ذلك يتضح لنا أن أصغر جسم يمكن تمييزه بوضوح بالميكروسكوب الضوئى يجب أن لايقل قطره عن ٢ , . ميكرون تقريباً .

ويلاحظ أن العين لا تستطيع أن تميز بين أجسام تبعد عن بعضها مسافة تقل عن ٢٠ ميكرون (أى ٢, من المليمتر) ولا تستطيع أن ترى أجساماً يقل قطرها عن ذلك أيضا ولذلك فانه يجب تكبير الصورة التى تكونها الشيئية فى المجهر المركب حتى تستطيع العين أن تراها منفصلة عن بعضها . فمثلا إذا كانت قوة تفصيل (تمييز) عدسة شيئية ٢, ميكرون فلكى تستطيع عين الفاحص أن ترى هذا التفصيل يجب أن يكون التكبير الكلى للميكروسكوب ١٠٠٠ مرة بحيث تكبر مسافة الـ٢,. ميكرون إلى ٢٠٠ ميكرون .

مما تقدم نعتقد أننا نستطيع الآن أن نقنع من يتساءل لماذا لا تصنع ميكروسكوبات ضوئية ذات قوة تكبيرية أعلى من المتوفر فاذا فرضنا حدوث ذلك فان التكبير الناتج لا يصاحبه أى تفصيل (تمييز) ويكون تكبير عديم القيمة من حيث الكشف عن التركيب الدقيق للجسم ويطلق عليه تكبير أجوف Empty maginfication . وبذلك فان التكبير والتفصيل (التمييز) مكملان لبعضهما فتكبير بدون تمييز هو تكبير أجوف لا يكشف عن تفاصيل جديدة كما أن تمييزاً بدون تكبير كاف لا تستطيع العين أن تراه .

وبالرجوع إلى معادلة قوة التفصيل السابقة يظهر لنا أن قوة التفصيل (التمييز) للعدسة تزداد كلما قصر طول الموجة الضوئية المستعملة ، فبينما تكون أصغر مسافة يمكن تمييزها بين جسمين صغيرين منفصلين ومتجاورين يمكن للميكروسكوب الضوئى المركب هى مسافة ٢,. ميكرون فانها تكون مع ميكروسكوب الأشعة فوق البنفسجية = ١, . ميكرون وبالميكروسكوب الألكترونى = ٠٠٠١ , ٠ ميكرون .

البعد البؤرى المكافىء Equivalent focus length

يقدر لكل عدسة بسيطة بعداً بؤرياً Focal length خاصاً بها ونظراً لأن العدسة الشيئية هى عبارة عن عدسة مركبة تتكون من عدد من العدسات فانه يوجد لها بعدا بؤريا خاصاً يعبر عنه بالبعد البؤرى المكافىء ، وهو يقدر بالبعد البؤرى النظرى لعدسة بسيطة لها نفس قوة تكبير الشيئية المركبة ، ويقدر البعد البؤرى المكافىء بالمليمتر أو بالبوصة . وعموما فى حالة تساوى عدستين فى البعد البؤرى فانه يفضل ذات الفتحة العددية(NA) المرتفعة على الأخرى ذات الفتحة العددية المنخفضة ، وعموما فان الشيئية ١٦ مم (أى بعدها البؤرى المكافىء = ١٦ مم) تكون ذات فتحة عددية = ٠.٢٨ والشيئية ٤ مم (بعدها البؤرى المكافىء ٤ مم) تكون ذات فتحة عددية ٠,٦٥ والشيئية ٢ مم (بعدها البؤرى المكافىء ٢ مم) تكون قيمة الفتحة العددية لها ١,٢٥ .

مسافة الفحص Working distance

هى المسافة بين مقدمة الشيئية والسطح العلوى للجسم (فى حالة عدم استعمال غطاء شريحة) أو المسافة بين مقدمة الشيئية والسطح العلوى لغطاء الشريحة (عند استعمال غطاء الشريحة) . فاذا كان غطاء الشريحة أسمك من مسافة الفحص للشيئية فانه من المستحيل مشاهدة الجسم المغطى متبوئراً in focus وكلما زادت قوة تكبير الشيئية كلما قلت مسافة الفحص ولزم استعمال أغطية للشرائح رقيقة وعادة يكتب سمك غطاء الشريحة الذى يمكن استعماله مع الشيئيات المرتفعة القوة .

الشيئيات المغموسة فى الزيت Oil - Immersion Objectives

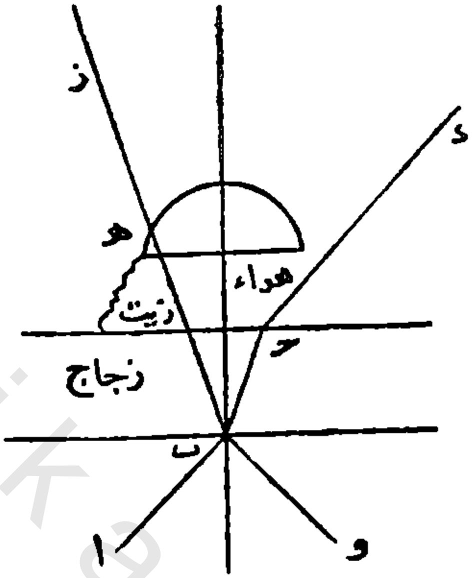
إذا كانت مسافة الفحص لشيئية يملؤها الهواء فانه يطلق عليها شيئية جافة

Dry أما فى حالة الشيئيات المرتفعة التكبير وذات مسافة فحص صغيرة (٢ مم) فان مسافة الفحص تملأ بقليل من زيت خشب السيدر Cedar-wood oil (أحيانا يستعمل زيت صناعى مصنع) يشبه زيت السيدر مثل زيت شيلابر الصناعى * Shellaber's synthetic immersion oil وله معامل انكسار = ١,٥١٥٠) . ويطلق عليها أنها شيئية مغموسة فى الزيت حيث أن زيت السيدر يزيد من مقدار الفتحة العددية للشيئية حيث يزداد معامل انكسار الضوء فيه (١,٥١) وتستطيع فتحة الشيئية أن تجمع أكبر مقدار من الضوء الذى ينبعث من نقطة أمامها . فنظراً لأن زيت السيدر له معامل انكسار للضوء يعادل معامل انكسار الزجاج (١,٥١) فان أشعة الضوء التى تنفذ من السطح العلوى للشريحة (أو غطاء الشريحة) إلى فتحة الشيئية لا يحدث فيها انكسار . والسبب فى ذلك أنه باستعمال شعاع ضوئى مائل ويمر من الشريحة الزجاجية إلى الهواء فانه ينكسر للخارج (شكل ٢٧) أما إذا ملىء الفراغ بين الشيئية والجسم بواسطة زيت السيدر فان الأشعة لن تنكسر (حيث أن معامل الإنكسار للزجاج والزيت متقارب) وتمر إلى الشيئية ، وبذلك فان سعة مخروط الضوء الذى يدخل العدسة يزداد ، وبذلك تزداد قوة التميز Resolution .

المجهر ذو الحقل المظلم

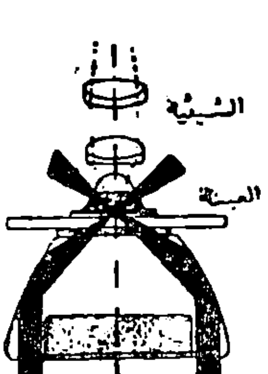
استعمال الحقل المظلم فى الفحص المجهرى يسهل رؤية العينة وهى بحالة إضاءة زاهية فى حين أن باقى الحقل المجهرى من حولها يظهر مظلماً . ويمكن الحصول على هذا التأثير بتزويد المجهر الضوئى بنوع معين من المكثفات يمكنها توجيه الضوء الصادر من مصدر الإضاءة بالطريقة المبينة (بشكل ٢٨) فاذا كانت العينة شفافة ومتجانسة ، فان الضوء الموجه إليها عن

* Product of R. p. Cargille Laboratories Inc New York.



(شكل ٢٧) : رسم تخطيطى بين مسار الأشعة خلال عدسة جافة (إلى اليمين) وخلال عدسة زيتية (إلى اليسار) لاحظ انكسار الشعاع الضوئى المائل أ ب جـ د خلال مروره من زجاج الشريحة إلى الهواء مع مقارنته بالشعاع وب هـ ز الذى يمر إلى فتحة العدسة الزيتية بدون حدوث انكسار خلال زيت السيدر .

طريق المكثف لا يمر خلال العدسة الشيئية ، فيبدو حقل الرؤيا معتما . وإذا كان بالعينة أجسام عالقة فى بيئة شفافة تختلف عنها فى معامل كسرها للضوء ، فان بعثرة الضوء نتيجة للانعكسات والانكسارات الضوئية المختلفة ودخول الضوء المبعثر خلال العدسة الشيئية يؤدى إلى ظهور الأجسام العالقة بالعينة بحالة مضيئة وسط حقل غير مضىء أو مظلم ، واستعمال طريقة المجهر ذى الحقل



(شكل ٢٨) : طريقة مرور الضوء خلال مكثف الحقل المظلم لاحظ أنه لا يدخل العدسة الشيئية أى ضوء سوى ذلك الذى يصطدم بالأجسام أو الأشياء المتواجدة فى وسط متجانس شفاف

obeikandi.com

المظلم لها قيمة عملية فى دراسة وفحص التحضيرات البكتيرية غير المصبوغة والعالقة فى نقطة من البيئة بطريقة النقطة المعلقة والتى سيلى وصفها فيما بعد .

الدراسات المجهرية باستعمال الاشعة فوق البنفسجية

ان المميزات الأساسية لهذه الطريقة من طرق الدراسات المجهرية هى الحصول على درجة عالية من الوضوح وبالتالى درجة أعلى من التكبير عن استعمال الضوء المرئى . والسبب فى ذلك يرجع إلى أن الأشعة فوق البنفسجية ذات موجة أقل طولا من الضوء المرئى . وحيث أن طول موجة الضوء المرئى كما سبق بيانه ، تعتبر من العوامل المحددة للقدرة التميizية للمجهر الضوئى ، فانه يمكن باستعمال مصدر من الأشعة فوق البنفسجية أن تزيد قوة التكبير بما يقرب من مرتين أو ثلاث مرات عن تلك التى نحصل عليها بالميكروسكوب الضوئى العادى

ويختلف المجهر ذو الاضاءة بالأشعة فوق البنفسجية عن المجهر الضوئى فى أن عدسات الأول تكون مصنوعة من مادة الكوارتز ، وفى استعماله الأشعة فوق البنفسجية بدلا من الضوء المرئى . وحيث أن الأشعة فوق البنفسجية تكون عادة غير مرئية فان المجهر يكون مجهزا بجهاز للتصوير حيث يؤخذ صورة للعينة التى تحت الفحص ويشترط تحميضها وطبعها فيما بعد

الدراسات المجهرية الفلورسنتية Fluorescence microscopy

هناك بعض المواد الكيماوية التى تتميز بقدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية فى حين أن لها القدرة على إشعاع موجات ضوئية مرئية أكثر طولا ، لذلك فاننا نجد مادة تظهر بلون معين إذا ماعرضت للضوء العادى فى حين أنها تبدو بلون آخر مختلف عن الأول إذا عرضت للأشعة فوق البنفسجية .

مثل هذه المواد يطلق عليها مواد فلورسنتية fluorescent . وتعرف هـذه الظاهرة باسم fluorescence .

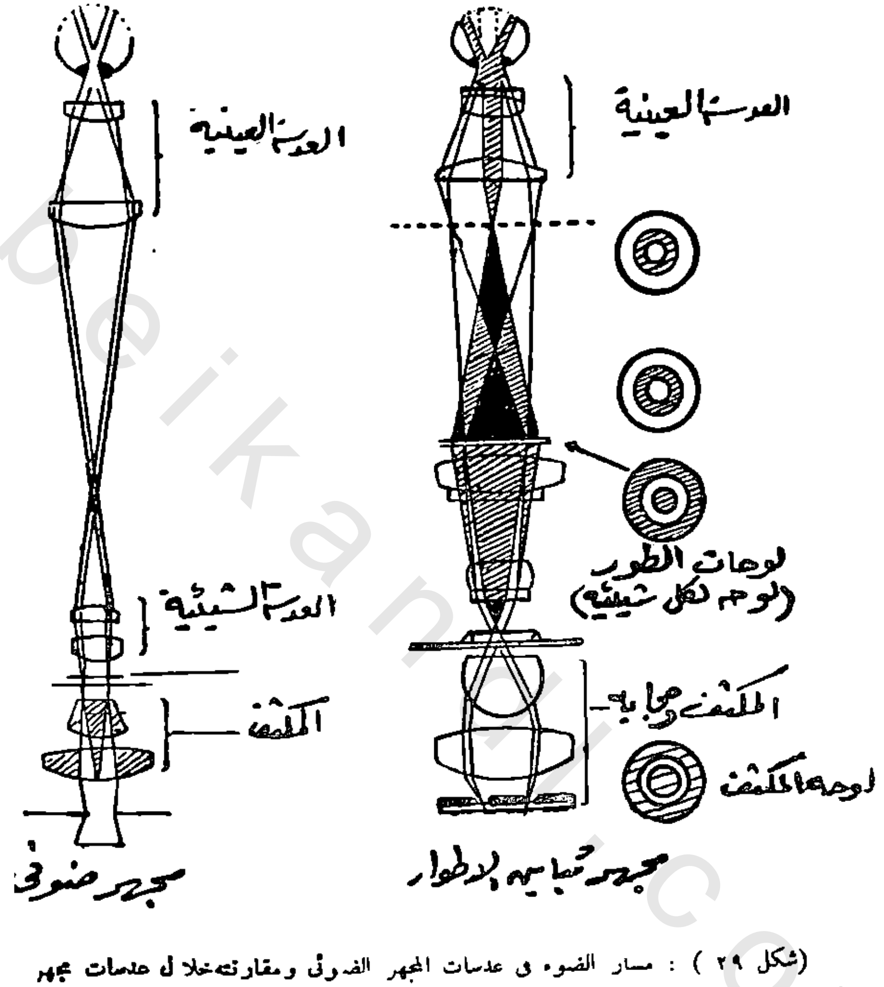
فاذا ما عومل خليط من خلايا البكتيريا بمحلول من صبغة تتميز بهذه الظاهرة fluorescent stain فان الخلايا التى تأخذ هذه الصبغة تصبح بدورها ذات قدرة فلورسنتية ، ويمكن مشاهدتها بواسطة المجهر ذى الإضاءة فوق البنفسجية . وتستخدم هذه الطريقة فى حالات خاصة منها اختبار المواد التى يشك فى احتوائها على ميكروب السل . وفى هذه الحالة تستعمل صبغة فلورسنتية تعرف باسم auramine O حيث أن خلايا ميكروب السل تأخذ هذه الصبغة وعندما تفحص مجهريا بواسطة الأشعة فوق البنفسجية تظهر الخلايا مضيئة فى حين أن الحقل المجهرى يبدو مظلماً . وحيث أن عددا كبيرا من البكتيريات لا يأخذ هذه الصبغة فان هذا الاختبار يعتبر اختبارا متخصصا للتأكد من وجود ميكروب السل فى إفرازات المرضى .

الفحص المجهرى باستعمال طريقة الاطوار المتباينة

Phase contrast microscopy

تعتبر طريقة حديثة نسبياً فى الدراسات المجهرية للكائنات الحية الدقيقة . وهى تستخدم نوعا من الاضاءة التى تتحكم فيها عدسة شيئية معينة phase contrast objective ونوعا من المكثفات التى تلحق بالمجهر العادى . و (شكل ٢٩) يوضح طريقة مسار الضوء خلال الأجزاء البصرية لمجهر يحتوى على الملحقات الخاصة بالأطوار المتباينة .

وتعتمد هذه الطريقة على الحقيقية المعروفة عن انكسار الضوء واختلاف أطواره عند مروره من مادة إلى أخرى مختلفة عنه فى الكثافة ينتحى الضوء



(شكل ٢٩) : مسار الضوء فى عدسات المجهر الضوئى ومقارنته خلال عدسات مجهر الأطوار المتباينة . إن مجهر الأطوار المتباينة يتغلب على مشكلة شفافية العينة لاشتماله على كل من الحجاب الذى يتواجد تحت المكثف وقرص تشتيت الضوء الذى يوضع فى داخل أو على العدسة الشيئية وهذا يحدث أطوارا ضوئية تزيد من الفروق بين الضوء المباشر المشتت الصادر من العينة ويبين الرسم عدد من صفائح تشتيت الضوء المختلفة .

عن مساره الطبيعى إذا مامر خلال مادة أخرى . والمجهر الضوئى العادى لا يمكنه تمييز الاختلافات البسيطة فى معامل انكسار المواد المفحوصة فى حين أن المجهر المجهز بملحقات الأطوار المتباينة يمكنها تحويل الاختلافات الضوئية

obeikandl.com

هذه إلى اختلافات ملحوظة فى درجة الإضاءة . وهذا النظام الذى يمكنه التحكم فى الضوء يمكن به رؤية التفاصيل الدقيقة والتى تختلف فقط فى درجة سمكها أو فى معامل كسرها للضوء فهـــى تكشف إذن عن اختلافات دقيقة داخل الخلية وبـين أجزائها المختلفة بحيث لا يمكـن للطـرق المجهريـة السابقة إيضاحها . ويبـين (شكل ٣٠) مقارنة بين ما يمكن مشاهدته بطريقـــة الحقل المضىء ، والحقـل المظلم ، وطريقة الأطوار المتباينـــه .

(شكل ٣٠) كرات الدم البيضاء محاطة بكرات الدم الحمراء كما تبدو تحت المجهر (أ) باتباع طريقة الحقل المضىء (ب) باتباع طريقة الحقل المظلم (حـ) باتباع طريقة تباين الأطوار.

الطريقة الالكترونية للفحص المجهرى :

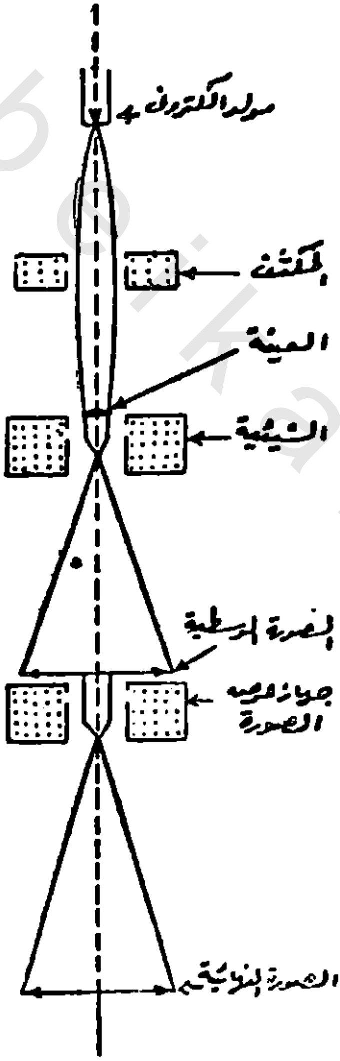
ان الفحص المجهرى الالكترونى يختلف كثيرا عـن الطـرق المجهريـة الأخرى السابق وصفها فالمجهر الالكترونى يتميز بقدرته التكبيرية العالية

(شكل ٢١) : مجهر الكتروني (ماركة سيمنز Siemens)

الدراسات

التى تزيد مائة مرة عن القدرة التكبيرية للمجهر الضوئى . ويرجع ذلك إلى القصر المتناهى لطول موجة الشعاع الالكترونى المستعمل . وكما هو موضح بشكلى ٣١، ٣٢ فان المجهر الالكترونى يكون مزودا بمصدر الكترونى للاضاءة وكذلك بحقول مغناطيسية لغرض تكوين صورة واضحة فى حين أن المجهر الضوئى يستعمل الضوء المرئى وعدسات زجاجية .

وللفحص المجهرى الإلكترونى تختبر العينة التى تجهز بشكل غشاء جاف رقيق جدا فوق شبكة صغيرة جداً . توضع فى المجهر بين المكثف الممغنط والشيئية المغناطيسية فى وضع يقابل مسرح المجهر الضوئى والصورة المكبرة يمكن مشاهدتها أو عرضها على شاشة فلورسنتية خلال نافذة محجوبة عن الهواء كما يمكن تسجيلها

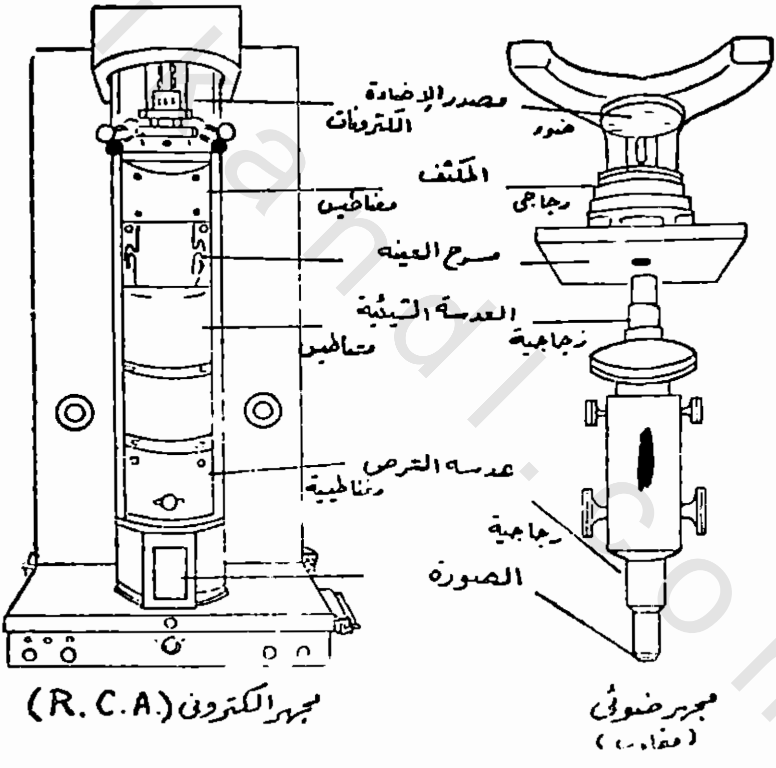


(شكل ٣٢): الأجزاء الأساسية لمجهر الكترونى (الكترومغناطيسى) لاحظ مسار الالكترونات وتكوين الصورة .

obeikandi.com

على لوحة فوتوغرافية بجهاز تصوير يزود به عادة المجهـــر الالكترونى شكل ٣١ .

ويمكن مشاهدة الصورة مكـــبرة خمسة وعشرين ألف مرة . كما يمكن زيادة هذا التكبير ليصل إلى مـــائتى ألف مـــرة عنـــد تكبير الصـــورة الفوتوغرافية بدون التأثير عـلى دقـــة تفاصيل الصـــورة المتحصـل عليهـا.



(شكل ٣٢) : الأجزاء الأساسيه للمجهر الألكترونى وما يماثلها فى المجهر الضوئى .

وقد زاد هذا النوع من المجهر قدرة الانسان على مشاهدة الأحياء الدقيقة حيث أمكن بواسطته مشاهدة جزيئات الفيروسات التى لم يمكن مشاهدتها من قبل كما ساعد وجود هذا المجهر على دراسة سيتولوجية الخلايا البكتيرية و الكائنات الدقيقة الأخرى .

وبالرغم من الفوائد العديدة للمجهر الالكترونى فى الدراسات الميكروبيولوجية إلا أن لاستعماله عدة عقبات أهمها :

١ — العينة التى تفحص يجب أن تكون جافة ، ومن المعروف أنه لا يمكن مشاهدة الخلايا تحت ظروف نشطة وحية وهى فى حالة جافة ، علاوة على أن عملية التجفيف قد تغير من الصفات المورفولوجية للخلايا .

٢ — أن قدرة الشعاع الالكترونى على التغلغل فى الخلايا ضعيفة .

٣ — لا يوجد من الأدلة مايبين التركيب الكيماوى أو الطبيعة الكيماوية للتركيبات الخلوية الدقيقة التى يمكن مشاهدتها .

٤ — إرتفاع ثمن مثل هذا المجهر .

والمشكلة الكبرى التى تعترض استعمال المجهر الالكترونى فى الدراسات الميكروبيولوجية ترجع إلى طريقة تفسير أو التعرف على التركيبات الجديدة التى يظهرها داخل الخلايا ، فمثلا قد تشاهد أجساما غامقة اللون داخل الخلايا البكتيرية لا يمكن الجزم هل هى أنوية أم حبيبات أو تركيبات بروتوبلازمية أخرى ، الأمر الذى يتطلب خبرة كبيرة للعمل بهذا الجهاز للتعرف على التركيبات المختلفة التى قد يظهرها داخل الخلايا ، وبالرغم من ذلك قد يظل الكثير منها غير متعرف على طبيعته .

مقارنة بين الطرق المجهرية المختلفة مع بيان مزايا وعيوب كل منها .

الطريقـــة	المميـزات	العيـــوب
أستعمال المجهر الضوئى مع الحقل المضيء .	يستعمل فى فحص الخلايا الحية أو الميتـة المثبتة والمصبوغـة .	لايمكن تميز الأشياء التى يقل قطرها عن ١٥ر-٢ر ميكرون بمعنى أن أى شئ أصغر من عشر عرض الخليـة البكتيرية لايمكن رؤيته .
أستعمال المجهر الضوئى مع الحقل المظلم .	يستعمل فى فحص الخلايا الحيـة حيث يمكن بواسطة هذه الطريقة رؤية التركيبات التى لايمكن مشاهدتها بطريقة أخرى .	لاتزيد القوة التميزية لهذه الطريقة عن الطريقة السابقة فيما عدا أنه يمكن رؤية الجزيئات الغرويـة أكبر حجماً .
المجهـر ذو الإضاءة فـــوق البنفسجيـة .	تزداد قدرة التميز حيث يمكن بواسطته رؤية الأجسام الصغيرة الحجم .	تمتص الأشعة فوق البنفسجية بواسطة القواعد النووية مثل البيورينات والبريميدينات Purines & pyrimidines حيث يمكن رؤية أجسام حلقية بكثرة داخل الخلايا .
مجهـر الأطوار المتباينـة . Phase-contrast	يستعمل فى فحص الخلايا الحية أو المثبتة والمصبوغة حيث يمكن بواسطته تميز التركيبات التى لايمكن رؤيتهابغيره من الطرق .	لايمكن بواسطته معرفـة تركيب المرئيات الجديدة التى يميزها .
المجهـر الالكترونى	قدرته التميزية مرتفعة جدا تصل إلى مائة مرة قدر تلك المشاهدة بالمجهر الضوئى .	يجب أن تكون التحضيرات جافة كما أن الاختلافات فى بعثرة الالكترونات لايمكن تعليلها .

فحص حركة البكتيريا

MOTILITY OF BACTERIA

بعض البكتيريات تكون متحركة Motile حركةحيويةVital movement في حين أن البعض الآخر لا تتحرك . وهذه الحركة الحيوية تعزى إلى وجود أعضاء للحركة تسمى الأسواط Flagella ؛

ويمكن دراسة حركة البكتيريا بالفحص الميكروسكوبى لخلايا البكتيريا الحية غير المصبوغة بواسطة تحضير النقطة المعلقة Hanging-drop prepartion ويجب التمييز بين الحركة الحقيقية الحيوية التقدمية للبكتيريا وبين الحركة البراونية Brownian movement فالأخيرة حركة تذبذبية للأمام والخلف تحدث لأى جسم صغير سواء كان حيا أو ميتا يكون عالقا فى سائل ما، وذلك نتيجة لإصطدام جزيئات السائل بهذا الجسم دون تغيير فى وضع الجسم بالنسبة للأجسام الأخرى العالقة فى السائل .

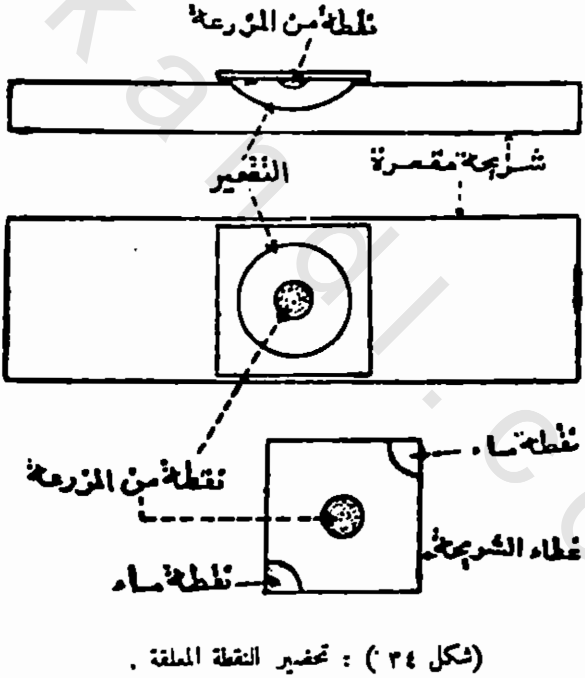
خطوات العمل :

١ ــ إنقل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة نقطة صغيرة من المزرعة البكتيريا حديثة العمر (١٨ ــ ٢٤ ساعة) نشطة النمو سواء نامية فى بيئة سائلة أم صلبة وفى الحالة الأخيرة يراعى تعليق النمو فى نقطة من الماء المعقم أو ماء معقم به قليل من الببتون وضعها فى مركز غطاء الشريحة النظيف . (يراعى النظافة التامة للشرائح المستعملة وأغطيتها) .

٢ ــ إنقل بواسطة الإبرة ذات العقدة أربع نقط صغيرة من الماء وضعها حول حواف تقعير الشريحة المقعرة النظيفة ويمكن أيضا وضع نقطتين صغيرتين

من الماء عند ركنين من أركان غطاء الشريحة المربع الشكل (شكل ٣٤) لابد من وضع ٤ نقط حول حواف التقعير (يمكن استعمال أجزاء صغيرة من الفازلين بدلا من الماء) . والغرض من ذلك هو تثبيت غطاء الشريحة بالشريحة المقعرة وعدم تبخر النقطة المعلقة أثناء الفحص .

٣ — إقلب باحتراس غطاء الشريحة ثم ضعه فوق الجزء المقعر للشريحة المقعرة Concave slide بحيث تكون النقطة المعلقة فى منتصف التقعير بدون أن تلامس قاعه (شكل ٣٤) .



(شكل ٣٤) : تحضير النقطة المعلقة .

٤ — ضع التحضير على مسرح الميكروسكوب مستعملا الشيئية الصغرى (١٦ مم) . حرك الضابط التقريبي حتى تظهر حافة النقطة المعلقة ويراعى تحريك الشريحة حتى تظهر حافة النقطة فى منتصف الحقل الميكروسكوبى ، ونظراً لأن النقطة شفافة فان حافتها لن تظهر إذا كانت الإضاءة شديدة لذلك

obeikandl.com

يجب تقليل الإضاءة بقفل الحجاب جزئياً وتخفيض المكثف قليلا (لا تفحص حافة تقعير الشريحة بدلا من حافة النقطة) .

٥ ــ أدر القطعة الأنفية لإستبدال الشيئية الصغرى ١٦ مم بالشيئية الكبرى ٤ مم .

٦ ــ إفحص حافة النقطة المعلقة مع إستعمال المعدل الدقيق . عــدل الإضاءة بخفض أو رفع المكثف واستعمال الحجاب حتى ترى الأحياء الدقيقة عند الحافة بوضوح .

٧ ــ صف مع الرسم حركة وشكل وطريقة تجمع خلايا الكائنات الآتية : مع بيان نوع الحركة .

Bacillus subtilis ، *Corynebacterium fascians*

Escherichia coli ، *Sarcina lutea*

(خميرة) *Saccharomyces cerevisiae*

obeikandi.com

٧

صبغ البكتيريا

THE STAINING OF BACTERIA

لما كانت الخلايا البكتيرية شفافة ، لذلك فهى تصبغ حتى يسهل رؤيتها فى التحضيرات الميكروسكوبية . وعلاوة على ذلك فان صبغ البكتيريا يعتبر ضروريا فى كثير من الأحيان لسهولة التعرف على بعض التركيبات الخلوية الخارجية ، مثل الأسواط والغلاف أو الداخلية مثل الحبيبات والجراثيم الداخلية ، والاجسام النووية وغيرها من التركيبات الداخلية الدقيقة .

ويمكن تقسيم الصبغات المستعملة إلى مايلى :

أولا – صبغات طبيعية : Natural dyes

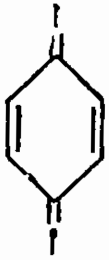
وهى الصبغات التى تنتج طبيعيا ويمكن استخلاصها من أنسجة النباتات وبخاصة فى الدراسات السيتولوجية ومن أمثلتها صبغة الهيماتوكسلين Hematoxylin والتى تستخرج من نبات *Hematoxylin campechianum* وهذه الصبغة فى حد ذاتها لا تصبغ الانسجة إلا فى وجود أيونات الحديد (فى صورة حديديك Ferric) أو أيونات الالومنيوم Aluminum .

ثانيا – صبغات صناعية أو تركيبية : Artificial or Synthetic dyes

وهى التى تستعمل حاليا بكثرة وتستخلص من قطران الفحم ، ولذلك تسمى أصباغ قطران الفحم Cool-tar dyes وأصباغ قطران الفحم هى عبارة عن مشتقات من المركب الحلقى البنزين Benzene ك٦ يد٦ C_6H_6 وقد تسمى أيضا أصباغ الانيلين Aniline dyes وبالرغم من وجود كثير من هذه الصبغات حاليا لا تشتق من الأنيلين ، إلا أنها تسمى كذلك

مجازاً ، حيث أن أول صبغة استعملت من هذه الصبغات كانت مشتقة من الأنيلين .

ونظراً لأن التسمية الكيميائية للأصباغ عموما طويلة جداً لا يمكن تداولها فى المجال الصناعى أو التجارى ، لذا يفضل المنتجون لها إعطاء أسماء خاصة للأصباغ التى ينتجونها ، ولذلك فان صبغة معينة قد تباع بالأسواق تحت أسماء مختلفة ، فمثلا الماجنتا Magenta ، والفوكسين ، إسمين مختلفين لصبغة واحدة حمراء وردية تركيبها الكيماوى بارا – روزأنيلين ، ولازالة هذه التضارب وضعت مواصفات خاصة لكل صبغة ، فنشرت جمعية الصباغين بانجلترا دليل اللون Colour Index ؛ وضع فيه رقم خاص لكل صبغة . وفى ألمانيا وضع شولز Schultz نشرة مماثلة للدليل السابق فمثلا الصبغة CI No.841 أو Schultz No. 679 تدل على أن الصبغة هى السفرانين Safranin 0



كينــــون

بنزين

كما أن كثيراً من الصبغات تحتوى على حلقة كينون Quinone ring

الصبغة Dye

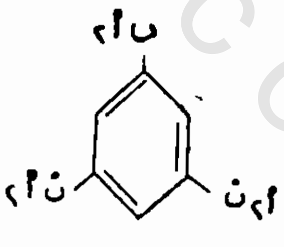
مركب عضوى يحتوى على مجموعات حاملة للون Chromophore group ومجاميع مساعدة للألوان Auxochrome group متصلة بحلقة بنزين .

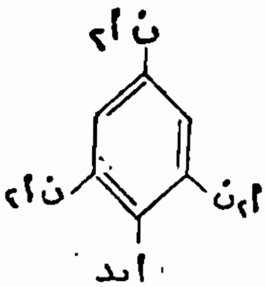
والمجموعة الحاملة للون تعطى للمركب خاصية اللون والمركب البنزينى

obeikandl.com

الذى يحتوى على أصل حامل اللون يسمى Chromogen ، وهذا المركب ولو أنه ملون إلا أنه ليس بصبغة . حيث أنه لا يمتلك القابلية للاتحاد بالألياف والأنسجة ولهذا فان هذا اللون يمكن إزالته بسهولة بطرق كيميائية . وليصبح المركب صبغة فانه يجب أن يحتوى ليس فقط على مجموعة حاملة للون ولكن يجب أن يحتوى على مجموعة أخرى مساعدة للون Auxochrome لتعطى المركب خاصية الإنحلال الألكتروليتى Electrolytic dissociation . وعلى ذلك فان المجموعة المساعدة للون تهيىء للمركب خاصية تكوين الأملاح .

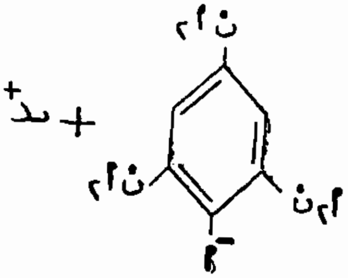
فمثلا مجموعة النيترو NO_2 تعتبر مجموعة حاملة للون وأن المركب ثلاثى ـ نيترو ـ بنزين Trinitrobenzene ذو اللون الاصفر يعتبر Chromogen وليس بصبغة حيث أنه لا يتحلل الكتروليتيا ولذلك لا يكون أملاحا مع الأحماض أو القواعد ، فاذا استبدلنا ذرة ايدروجين أخرى من حلقة البنزين مع مجموعة مساعدة للون مثل مجموعة الهيدروكسيل فان المركب الناتج الذى يسمى حمض البكريك picric acid . وحمض البكريك ذو اللون الاصفر





ثلاثى ـ نيترو ـ بنزين　　　　حمض بكريك

الذى يعتبر حينئذ صبغة لقابليته للانحلال الإلكتروليتى كالآتى :



ويلاحظ أن الجزء الصبغى Dye portion من المادة يعتبر أنيون Anjon ويحمل شحنة كهربائية سالبة وتعتبر المادة حينئذ صبغة حمضية Acid dye يمكنها تكوين أملاحا مع القواعد . أما الصبغة القاعدية فاذا تأينت فان الجزء الصبغى من المادة يكون كاتيون Cation ويحمل شحنة كهربائية موجبة .

والصبغات التجارية ليست قواعد أو أحماض إذ هى عادة أملاح فالصبغات القاعدية أملاح لقواعد ملونة ، عادة كلوريدات وأحيانا كبريتات أو خلات أما الصبغات الحامضية فهى أملاح ملونة عادة أملاح صوديوم وأحيانا أملاح بوتاسيوم أو كالسيوم أو الأمونيوم . والصبغات الحامضية تستعمل أساسا لصبغ السيتوبلازم . أما القاعدية فهى تصبغ المادة النووية بدرجة أكبر من السيتوبلازم . والصبغات القاعدية أكثر استعمالا فى دراسة البكتيريا نظراً لأن الخلية البكتيرية غنية فى الأحماض النووية والتى تحمل شحنة سالبة فهى تصبغ بشدة بالصبغات القاعدية . ومن أمثلتها الفوكسين القاعدى والكريستال البنفسجى وأزرق الميثلين والسفرانين .

نظرية الصبغ Theory of staining

هناك عدة نظريات يفسر على أساسها حدوث الإصطباغ عند استعمال الصبغات المختلفة منها مايستند على أسس فيزيائية ومنها مايستند على أسس كيماوية .

obeikandi.com

(١) النظرية الفيزيائية physical theory

تعرف العملية الفيزيائية بأنها تفاعل بين مادتين دون أن يتكون مركب جديد نتيجة للتفاعل وتفسر عملية الإصطباغ بأنها نتيجة الخاصية الشعريــة أو القوى الأسموزية أو إلى الإدمصاص أو الامتصاص .

(ب) النظرية الكيماوية Chemical theory

يتكون نتيجة لتفاعل الكيماوى بين الصبغة والمادة المصبوغة مركب جديد له صفات طبيعية وكيماوية مختلفة عن المواد المتفاعلة الأصلية ، وبالتالى لايمكن استرجاع المواد المتفاعلة الأصلية بواسطة المذيبات البسيطة .

وعندما تصبغ البكتيريا بالصبغات السالفة الذكر . لا يوجد دليل قوى يبين أن الصبغة تتغير كيماوياً ليتكون مركب جديد لا يمكن استخلاصة . ففى الحقيقة يمكن استخلاص كل الصبغة تقريباً من الخلية البكتيرية المصبوغـة عقب غمرها لمدة طويلة فى الماء أو فى الكحول أو فى المذيبات الأخرى . ومن الناحية الأخرى توجد مكونات فى الخلية تعتبر حمضية فى تفاعلها وأخرى ذات تأثيراً قلوياً ، وعلى ضوء هذه الحقيقة يمكن تفسير ظاهرة الصبغ على أساس كيماوى بحت ، فالصبغات الحمضية تتفاعل مع المكونات القاعدية من الخلية (السيتوبلازم) والصبغات القاعدية تتفاعل مع المكونات الحمضية من الخلية (كروماتين النواه) . مما تقدم يتضح لنا التضارب فى تفسير اصطباغ البكتيريا . والواقع أن عمليات الإصطباغ لاتتم بالبساطة السابق وصفها ، وربما كانت هذه النظريات لا تفسر كل الحقائق . وقد يكون صبغ الخلايا عبارة عن عملية فيزيائية وكيماوية فى نفس الوقت .

معمق اللون Mordant

فى بعض محاليل الصبغات يمكن إضافة مواد لها قابلية بأن تجعل بعض التركيبات تأخذ كمية من الصبغة أكثر مما يحدث فى غياب هذه المادة ، تسمى هذه المواد بمعمقات الألوان Mordants مثل حمض التانيك Tannic acid واليود وأيونات الحديديك .

الصبغ البسيط Simple Staining

يقصد بالصبغ البسيط استعمال صبغة مفردة فى صبغ خلايا البكتيريا ، ويتم الصبغ بعد أن يحضر غشاء من معلق الخلايا البكتيرية فى الماء على شريحة نظيفة ، ويثبت الغشاء بعد ذلك حراريا ، وذلك بترك الشريحة أولا ليجف عليها الغشاء بجو المعمل ، ثم تمرر الشريحة عدة مرات فى لهب بنزن . وتعتبر طريقة التثبيت الحرارى هذه طريقة مثلى ، فالخلايا البكتيرية ذات جدر صلبة لا تتأثر ولا تتشوه عندما تجف وتثبت على هذا النحو .

ويجب الإهتمام بنظافة الشريحة إذ أن وجود آثار من المواد الدهنية عليها يعيق توزيع معلق الخلايا توزيعاً منتظماً على سطحها كما أن ذلك يؤثر على درجة ثبات الغشاء على سطح الشريحه فيكون عرضة للغسيل أثناء عملية الصبغ .

ولتحضير الغشاء البكتيرى يفضل استعمال مزرعة نامية على بيئة صلبة حيث أن الغشاء المحضر من مزرعة سائلة مباشرة تشتمل على مكونات البيئة وهى أيضاً قابلة للاصطباغ ، وعلاوة على ذلك فان وجود مكونات البيئة قد يؤدى إلى تقليل درجة التصاق الخلايا بالشريحة أثناء التثبيت .

خطوات العمل :

١ — مرر شريحة نظيفة فى لهب بنزن للتخلص مما قد يكون عالقاً بها من

آثار دهنية . انتظر حتى تبرد الشريحة ، ثم ضع بواسطة الإبرة ذات العقدة نقطة من المـاء فى مركـز الشريحة (إذ كانت الشريحة نظيفة فانه يمكن فرد نقطة من الماء على سطحها بانتظام بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة ، أمـا الشريحة غير النظيفة فان نقطة الماء تتجمع عليها بشكل قطرات متفرقة ، وبذلك لايتكون غشاء منتظماً) .

٢ — إلمس النمو البكتيرى من مزرعة نامية على آجار مائل بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها . (يراعى عدم نقل كمية كبيرة من النمو البكتيرى . أو أخذ جزء من الآجار إلى الشريحة إذا أن ذلك يعيق رؤية البكتيريا بوضوح . علاوة على العيوب الأخرى الناتجة عن مكونات البيئة) .

٣ — أنقل مايعلق بابرة التلقيح إلى نقطة الماء بمركز الشريحة وأخلطه بها حتى تتكون عكارة خفيفة . أنشر المعلق البكتيرى الناتج بنفس إبرة التلقيح حتى يتكون غشاء رقيق منتظم

٤ — أترك الغشاء ليجف تماماً فى الهواء

٥ — ثبت الغشاء الجاف بتمرير الشريحة عدة مرات فى لهب بزن (يراعى أن يكون سطح الشريحة الذى عليه الغشاء متجهاً باستمرار إلى أعلى) .

٦ — انتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر سطح الشريحة بكمية كافية مـن محلول صبغة كربول الفوكسين Carbol fuchsin . لمدة دقيقة .

٧ — تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الشريحة بواسطة الماء الجارى .

٨ — أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء .

٩ — ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً . بواسطة العدسة الزيتية ويتم ذلك بعد ضبط الضوء بالاستعانة بالمرآة والمكثف

والحجاب مستعملا القوة الصغرى (١٦ مم) . ثم تحرك القطعة الأنفية لوضع العدسة الزيتية فى وضع الإستعمال ، ثم حرك الضابط التقريبى ليمكن إنزال أنبوبة الميكروسكوب بحذر حتى تنغمس العدسة الزيتية (٢ مم) فى نقطة الزيت . وتتم هذه الخطوة والعينان تنظران تنظران إلى الشريحة والعدسة الزيتية . ثم ينظر بعد ذلك خلال العدسة العينية ويحرك الضابط الدقيق حتى ترى الخلايا البكتيرية بوضوح .

١٠—صف مع الرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات البكتيرية والخميرة الآتى بيانها عند فحص تحضيراتها مصبوغة بكربول الفوكسين :

Corynebacterium fascians , *Bacillus subtilis* , *Sarcina lutea*, *Escherichia coli* , *Pseudomonas margiuata* , *Streptomyces sp.* *Staphylococcus aureus*, *Saccharcmyces ccreviscae.*

١١—كرر الخطوات العشر السابقة باستعمال صبغة أزرق الميثلين بدلا من صبغه كاربول الفوكسين .

الصبغ المركب Compound staining

تستعمل فى هذه الطرق أكثر من صبغة واحدة ، ويعرف هذا النوع من الصبغ أيضاً بالصبغ التفريقى Differential staining ، وخاصة عندما تجرى التفرقة بين البكتيريات تبعاً لقابليتها للأصباغ المستعملة ، وعلى أساس ذلك يمكن تقسيم البكتيريات فى مجاميع مختلفة تبعاً لتفاعلها مع الصبغة .

وتعتبر صبغة جرام والصبغ المقاوم للأحماض من أهم طرق الصبغ المركب أو التفريقى المتبعة فى الدراسات البكتريولوجية .

١ — صبغة جرام Gram stain

أهم طرق الصبغ المركب أو الصبغ التفريقى وأول من إستعملها «كريستيان جرام Christian Gram, » ١٨٨٤ ، لذلك فهى تعرف باسمه ، وعند اتباع هذه الطريقة نجد أن بعض البكتيريات تصبغ بالصبغة القاعدية «الكريستال البنفسجى Crystal violet» فى وجود اليود ، بدرجة لا يمكن معها إزالة الصبغة من الخلايا عن طريق الغسيل بالكحول أو الاسيتون ، فى حين أن البعض الآخر من خلايا البكتريا يمكن إزالة الصبغة منها بسهولة باستعمال الكحول . والمجموعة الأولى من البكتيريات تعرف بالبكتريا الموجبة لتفاعل جرام Gram positive . أما المجموعة الثانية فهى تعرف بالبكتريا السالبة لتفاعل جرام Gram negative . ولتسهيل رؤية خلايا المجموعة الثانية تستعمل صبغة أخرى ذات لون أحمر مثل السفرانين Safranin ، والتى تضاف بعد الغسيل بالكحول وتسمى بالصبغة العكسية Counter stain ؛ حيث تصطبغ الخلايا السالبة بعدها باللون الأحمر .

ويبدو أن التفسير الحقيقى لهذا الإختلاف يرجع إلى أسس كيماوية ، الدراسات

إذ أن سطوح الخلايا الموجبة لصبغة جرام أو الجزء القريب من سطوحها ، يحتوى على كميات من ملح المغنسيوم لحمض الريبونيوكليك Ribonucleic acid والتى تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوى وصبغة الكريستال البنفسجيةواليود.وهذا المركب المعقد يثبت الصبغة فى الخلية ويجعلها أكثر مقاومة للازالة عند الغسيل بالكحول . أما البكتيريا السالبة لصبغة جرام فان التركيب الكيماوى لسطح خلاياها لايحتوى على حمض الريبونيوكليك والمغنسيوم ، لذلك فان صبغة الكريستال البنفسجى لاتثبت فى الخلايا بالطريقة السابق وصفها فهى تزال عند الغسيل بالكحول .

وبالرغم من أن البكتيريات السالبة لصبغة جرام تظل باستمرار سالبة لهذه الصبغة ، إلا أن البكتيريات الموجبة يمكنها تحت ظروف خاصة أن تظهر تفاعلات متباينة مع هذه الصبغة أو أن تفقد إيجابيتها لها . فمثلا المزارع الموجبة لجرام قد تفقد خلاياها القدرة على الاحتفاظ بصبغة الكريستال البنفسجى عندما تتقدم فى السن وتصبح سالبة لها ، وكذلك قد تتأثر الخلايا الموجبة لجرام عند إرتفاع حموضة البيئة ، كما تفقد الخلايا الموجبة لجرام إيجابيتها إذا عوملت خلاياها بأنزيم Ribonuclease الذى يذيب Ribonucleic acid أو أملاحه من السطح الخلوى ، أو إذا سحقت الخلايا الموجبة لجرام مع برادة الزجاج أو الألمنيوم لتكسير جدرها الخلوية فان بقايا الخلايا المهشمة تفقد إيجابيتها لهذه الصبغة .

وقد أجريت تعديلات طفيفة على الطريقة التى أتبعها جرام ، وفيما يلى خطوات الصبغ كما حورها هوكر Hucker وهى الخطوات الأكثر إتباعاً.

خطوات العمل :

١ — حضر غشاء من المزرعة البكتيرية النامية على آجار مائل لمدة ٢٤—٤٨ ساعة ، ويثبت بتمريره فى اللهب عدة مرات بالطريقة الموضحة سابقاً .

٢ — أنتظر حتى تبرد الشريحة . ثم أغمر الغشاء بمحلول صبغة الكريستال البنفسجى Crystal violet لمدة دقيقة .

٣ — تخلص من محلول الصبغة ، ثم أغسل الشريحة بالماء الجارى .

٤ — أغمر الغشاء بمحلول اليود لمدة دقيقة .

٥ — تخلص من محلول اليود ثم أغسل الشريحة بالماء الجارى ، ثم أتركها لتجف فى الهواء .

٦ — إغسل الغشاء بمحلول كحول الإيثايل (٩٥ ٪) وذلك باضافتهللشريحة نقطة فنقطة مع إمالة الشريحة ليتساقط منها الكحول بعد مروره على الغشاء ، وتستمر الإضافة حتى يصبح الكحول المتساقط عديم اللون .

٧ — إغسل الغشاء بعد ذلك بالماء الجارى .

٨ — أغمر الغشاء بمحلول صبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة .

٩ — تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل بالماء الجارى .

١٠ — أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء . يمكن الإسراع فى التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن .

١١ — ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم أفحص ميكروسكوبيا باستعمال العدسة الزيتية .

obeikandl.com

إذا كانت الخلايا بنفسجية تكون البكتيريا موجبة لجرام وإذا كانت حمراء تكون البكتيريا سالبة لجرام .

١٢ – حضر أغشية مثبتة من البكتيريا *E. coli, Corynebacterium fascians* *Bac. subtilis* ثم أصبغها بطريقه جرام . بين تفاعل البكتيريا مع الصبغة مبينا شكل ونظام تجمع الخلايا .

obeikandi.com

ب – الصبغة المقاومة للاحماض ASID FAST STAIN

بعض الأنواع التابعة للجنس *Mycobacterium* مثل البكتيريا سالتي تسبب السل *Mycobacterium tuberculosis* تمتلك خواص طبيعية أو كيماوية تجعل من الصعب صبغ خلاياه بالطرق العادية ولكن إذا عرضت الشريحة للحرارة أثناء الصبغ لمدة طويلة نسبياً . فان الحرارة تعمل على دخول الصبغة إلى الخلية ويكون من الصعب إزالة الصبغة منها حتى ولو غسلت بالكحول ، المحمض بحامض يدكل . مثل هده البكتيريا تعرف بأنها مقاومة للأحماض Acid fast . أما إذا أمكن إزالة الصبغة من الخلايابواسطة الكحول المحمض فتعرف بأنها غير مقاومة للأحماض Non - acid fast .وعلى ذلك فالبكتيريا المقاومة للأحماض مظ بصبغة كربول الفوكسين – التي تستعمل عادة فى هذه ، الطريقة – وتظهر الخلايا بلون أحمر أما البكتيريا غير المقاومة للأحماض فتزال منها الصبغة عند الغسيل بالكحول المحمض ، ولتسهيل رؤية الخلايا غير ، المقاومة للأحماض تضاف صبغة عكسية Counter stain ذات لون مخالف مثل أزرق الميثلين . وبذلك تظهر بلون أزرق .

ويرجع السبب الأساسى للاختلاف بين هاتين المجموعتين من البكتيريا إلى وجود تركيزات مرتفعة من الدهون فى الأغشية السيتوبلازمية لخلايا البكتيريات المقاومة للأحماض . وهده الدهون تمنع أو تؤخر دخول الصبغة إليها أو خروجها منها . ويعتقد بعض الباحثين أن وجود حمض الميكوليك Mycolic acid فى البكتيريات المقاومة للأحماض بنسبة كبيرة قد يكون السبب المحتمل لإيجابيتها .

وفيما يلى طريقة Ziehl& Neelsen لصبغ البكتيريا بالصبغ المقاوم للأحماض .

خطوات العمل :

١ — حضر غشاء من مزرعة البكتيريا *Mycobacterium phlei* و آخر من مزرعة البكتيريا *E. coli* ثم يثبت بتمريره فى اللهب .

٢ — إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر منطقة الغشاء بمحلول صبغة كربول الفوكسين . سخن السطح السفلى من الشريحة حتى يتصاعد منها البخار (دون أن تغلى الصبغة) لمدة ٣ — ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة بإضافة مزيد من الصبغة إذا لزم الأمر .

٣ — أنتظر حتى تبرد الشريحة ثم تخلص من الصبغة بغسل الشريحة بالماء الجارى .

٤ — يضاف الكحول المحمض على الغشاء نقطة فنقطة عند أحد أطراف الشريحة مع إمالتها قليلا ليتساقط منها الكحول المحمض المستعمل من الطرف الآخر إلى أن يصبح الكحول الحامضى المتساقط عديم اللون .

٥ — إغسل بالماء الجارى .

٦ — أصبغ الغشاء بمحلول الصبغة العكسية وهى صبغة أزرق الميثلين لمدة دقيقة .

٧ — إغسل محلول الصبغة بالماء الجارى .

٨ — أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء ، يمكن إسراع التجفيف بتعريض الشريحة إلى الهواء الساخن فوق لهب مصباح بنزن .

٩ — ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة ثم أفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملا العدسة الزيتية . بين ماإذا كانت الخلايا مقاومة

للأحماض أو غير مقاومة للأحماض . صف مع الرسم شكل ونظام تجمع ، خلايا البكتيريا المحضرة .

وعلاوة على طرق الصبغ التفريقية السالفة الذكر فان هناك طرقاً من الصبغ المركب تتبع لاظهار تركيبات خلوية حيث أن هذه التركيبات دون غيرها تكون أكثر قابلية للاصطباغ بصبغة معينة . ومن ضمن هذه الطرق، صبغ الغلاف البكتيرى، صبغ الأسواط البكتيرية . صبغ الجراثيم الداخلية

oberkandl.com

صبغ الغلاف Staining of capsule

يحيط بجدار الخلية من الخارج منطقة هلامية لزجة يطلق عليها اسم الغلاف Capsule.أو الطبقة الخارجية Outer layer ،أو الطبقة الهلامية Slime layer ويختلف سمك طبقة الغلاف هذه فى البكتيريات المغلفة Encapsul ted ، وقد لاتو جد هذه الطبقة كلية بالبكتيريات غير المغلفة Nonencapsulated وفى معظم الحالات تتركب مادة الغلاف من عديدات التسكر Polysaccharides . ومن المعروف أن طبقة الغلاف هذه يصعب صبغها بالطرق العادية ، ولـذا يفضل إستعمال طرق خاصة عديدة لصبغ الغلاف منها طريقةAnthony الآتى بيان خطواتها :

خطوات العمل :

١ ــ حضر مزرعة حديثة من البكتيريا *Klebsiellu aerogenes*

٢ ــ حضر غشاء من المزرعة وأتركها لتجف فى الهواء (لاتستعمل ، الحرارة) .

٣ ــ أصبغ الغشاء بمحلول مائى للكريستال البنفسجى لمدة ٢ دقيقة .

٤ ــ تخلص من محلول الصبغة ثم أغسل الغشاء بمحلول كبرتيات النحاس (٢٠ ٪) ، (لاتستعمل الماء) .

٥ ــ أترك الشريحة لتجف مرة ثانية فى الهواء . يراعي أن يكون الجفاف تاما .

٦ ــ ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم أفحص ميكروسكوبيا بالعدسة الزيتية .

٧ ــ صف مع الرسم الخلايا ومايحيط بها من منطقة الغلاف ــ لاحظ أن الخلايا تظهر بلون أزرق غامق ، بينما تظهر طبقة الغلاف كهالة زرقاء باهتة .

صبغ الاسواط Flagella staining

ترجع الحركة فى معظم أنواع البكتريا المتحركة إلى إمتلاك خلاياها أسواطاً فى أطرافها أو على جانبها وحركة البكتريا وعدد وتوزيع الأسواط على خلاياها تعتبر من الصفات الهامة المميزة للأنواع البكتيرية تستغل فى أغراض التصنيف .

وكان يعتقد أن الأسواط عبارة عن تركيبات هشة سهلة التلف . وأنه يلزم عند صبغها الإهتمام الزائد بعدم رج البيئة التى تنمو عليها البكتيريا ، إلا أن الإتجاهات الحديثة تدل على أنها تركيبات صلبة تتحمل الرج والمعاملة بالطرد المركزى. والمشكلة الحقيقية فى صبغ الأسواط هو ضآلة سمكها الذى لايقع فى نطاق القوة التمييزية أو التفصيلية Resolving power للميكروسكوبات الضوئية . وعلى ذلك فان من أهم الخطوات التى تسبق عملية الصبغ إضافة بعض المواد التى ترسب على السوط لتزيد من سمكه بدرجة تجعل من الممكن مشاهدته بالميكروسكوبات الضوئية العادية إذا ماأجرى صبغه ، ويعتبر حمض التانيك Tannic acid من أهم المواد المستعملة فى هذا الغرض علاوة على أنه يعطى للأسواط قابلية أكثر على تقبل الأصباغ المستعملة . وهناك عدة طرق لصبغ الاسواط كلها تحتاج إلى خبرة ومران ودقة فى العمل . إلا أن جميعا تتفق فى ضرورة إستعمال شرائح غاية فى النظافة يستعمل لغسلها محاليل منظفة وحفظها نظيفة فى كحول إيثايل ٩٠ ٪ .

والطريقة الآتية تعطى نتائج معقولة إذا ماأتبعت بكل دقة .

خطوات العمل :

١ — جهز مزرعة من البكتيريا *Erwina carotovora* ، وأخرى من

Agrobacterium tumefaciens على آجار مائل . (عمر المزرعة يجب ألا يزيد عن ١٢ — ٢٤ ساعة) .

٢ — أغمر سطح المزرعة بالماء المقطر ، مع التحريك الخفيف .

٣ — انقل معلق الخلايا الخفيف جداً والمتكون بالأنبوبة إلى أنبوبة نظيفة أخرى ثم أترك الأنبوبة ½ — ١ ساعة ، فى خلال ذلك الوقت يجرى تحضير الصبغتين أ، ب (أنظر قائمة الاصباغ والمحاليل بآخر الكتاب) .

٤ — إنقل نقطة من معلق الخلايا إلى شريحة نظيفة (يلاحظ أن تاخـــد النقطة من سطح المعلق حيث أن معظم الخلايا المتحركة تكون عند السطح) . ضع الشريحة مائلة قليلا لتنحدر نقطة معلق الخلايا على الشريحة مكونة غشاء ثم تترك الشريحة لتجف فى الهواء .

٥ — أغمر الشريحة بمحلول الصبغة (ا) لمدة ٦ — ٨ دقائق

٦ — تخلص من الصبغة على سطح الشريحة وذلك بصبها فى الحوض المعد لذلك ثم أغسل الشريحة بالماء المقطر (إذا لم تغسل الشريحة جيداً بالماء المقطر فانه ستتكون ترسيبات غامقة تعيق الفحص الميكروسكوبى) .

٧ — أغمر الشريحة بالمحلول (ب) لمدة ٣٠ ثانية. ثم إغسل أيضاً بالماء المقطر

٨ — أترك الشرائح لتجف فى الهواء .

٩ — ضع نقطة من زيت السيدر على الغشاء ثم أفحص ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية .

١٠ — صف وإرسم البكتيريا مبيناً شكل الخلايـــا وعدد ووضع الأسواط على خلاياها .

صبغ الجراثيم Spore Staining

من المعروف أن الجراثيم الداخلية Endospores مقاومة بطبيعتها لتقبل الأصباغ فبالتالى لايمكن لطرق الصبغ العادية التى تستعمل فى صبغ الخلايا الخضرية للبكتيريا أن تؤدى إلى صبغها ، لذلك يستعان بطرق أخرى تستغل الحرارة لتسهيل إدخال الصبغة خلال جدر الجرثومة . وبمجرد دخول الصبغة إلى داخل الجرثومة فانها تثبت بها ويصعب إزالتها منها .

وهناك طرق عديدة لصبغ الجراثيم وفيما يلى وصفاً لطريقتين منها :

أولا — طريقة شافر ، وفولتون : Shaeffer & Fulton

خطوات العمل :

١ — حضر غشاء من مزرعة *Bacillus subtilis* النامية على آجار مائل لمدة ٤٨ ساعة ثم ثبته بتمرير الشريحة فى اللهب عدة مرات .

٢ — إنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغمر سطح الشريحة بمحلول مائى لصبغة أخضر الملاكيت (٥ ٪) ، وسخن الشريحة بتعريض سطحها السفلى للهواء الساخن فوق مصباح بنزن حتى يتصاعد البخار منها دون أن تغلى الصبغة ، أستمر فى عملية التسخين لمدة ٤ — ٥ دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة وذلك باضافة مزيد من الصبغة كلما لزم الأمر .

٣ — أنتظر حتى تبرد الشريحة ثم أغسلها بالماء .

٤ — أصبغ الغشاء بمحلول مائى للسفرانين لمدة دقيقة واحدة .

٥ — أغسل محلول الصبغة بالماء .

٦ — أترك الشريحة حتى تجف تماماً فى الهواء .

obeikandi.com

٧ — إفحص التحضير تحت المكروسكوب مستعملا العدسة الزيتية. تظهر الجراثيم الداخلية خضراء فى حين أن الخلايا الخضرية وبقاياها المتصلة بالجرثومة والتى يطلق عليها اسم الكيس الجرثومى Sporangium تكون حمراء اللون. إرسم بعضا من الخلايا الخضرية والجراثيم مبينا شكلها ووضع الجرثومة من الخلية الخضرية (طرفى ، تحت طرفى ، وسطى) وحجمها (مساوى أو أقل أو أكبر من قطر الخلية الخضرية) .

ثانيا — طريقة Dorner

خطوات العمل :

١ — حضر معلق كثيف من خلايا البكتيريا *Bacillus subtilis* فى ٢ — ٣ نقطة من الماء فى أنبوبة أختبار صغيرة .

٢ — أضف كمية مماثلة من كربول الفوكسين المرشح حديثاً إلى معلق الخلايا .

٣ — ضع المخلوط فى حمام مائى (١٠٠° م) لمدة ١٠ دقائق .

٤ — إخلط نقطة صغيرة من الخلايا المصبوغة مع نقطة صغيرة من محلول النجروسين المشبع على شريحة نظيفة (هذا المحلول يجب أن يرشح قبل الاستعمال) ثم تفرد على الشريحة بحيث يتكون غشاء رقيق .

٥ — أترك الغشاء ليجف ويفضل أن يجف الغشاء بسرعة وذلك بتعريض الشريحة للهواء الساخن فوق لهب بنزن .

٦ – إفحص التحضير تحت الميكروسكوب مستعملا العدسة الزيتيـــة.

الجر ثيم تظهر حمراء اللون أما الخلايا الخضرية والكيس الجرثومىSporangium فتكون شفافة فى وسط رمادى أو أسود

صف وارسم البكتيريا مبينا شكل وحجم الجراثيم ومواضعها من الخلايا الخضرية التى تحملها .

obeikandl.com

الصبغة السالبة Negative stain

عندما تخلط خلايا بكتيرية بمعلق من الفضة الغروى والمعروف بالكلارجول Collargol أوالحبر الهندى أو محلول النجروسين Nigrosin ، ثم يفرد المخلوط الناتج على سطح شريحه بشكل غشاء رقيق . ويترك ليجف فى الهواء فان جزيئات الصبغة سوف تتكدس حول الخلايا البكتيرية التى تظل شفافه واضحة فى وسط أسود اللون من حبيبات الصبغة.وتعرف هذه الطريقة بالصبغ السالب حيث أن الخلايا البكتيرية لاتتخذ أى لون بل أن الوسط المحيط بها هو الذى يتخذ اللون الأسود الداكن . ويمكن بواسطة هذه الطريقة دراسة الشكل الظاهرى للخلايا البكتيرية دون تعريضها لمعاملات حرارية أو كيماوية قد تؤثر على شكلها العام . كما أنه يمكن بواسطة الصبغ السالب مشاهدة البكتيريات التى يصعب صبغها بالطرق العادية وخاصة أفراد جنس *Spirocheata*

خطوات العمل :

١ — حضر مزارع حديثة من كل من :

Corynebacterium fascians, Bacillus subtilis, Sarcina lutea

E. coli, Saccharomyces cerevisieae

٢ — ضع نقطة من معلق النجروسين على شريحة زجاجية نظيفة .

٣ — إلمس النمو البكتيرى على الآجار بالمزرعة المستعملة بواسطة إبرة التلقيح ذات العقدة المعقمة لتنقل كمية قليلة من النمو ثم أخلطه بواسطة نفس الإبرة بنقطة النجروسين على الشريحة ثم أنشر المخلوط على الشريحة بشكل غشاء رقيق نسبياً . أترك الغشاء ليجف تماماً فى الهواء (لاحظ عدم إستخدام الحرارة لتجفيف الغشاء أو لتثبيته إذ أن محلول النجروسين يعمل على لصق الخلايا بالشريحة) .

٤ — ضع نقطةمن زيت السيدر على الغشاء ثم إفحصه ميكروسكوبياً بالعدسة الزيتية . صف وإرسم شكل ونظام تجمع خلايا الكائنات الدقيقة .

قياس حجم الخلايا البكتيرية المصبوغة

وبالرغم من صغر حجم الخلية البكتيرية إلا أنه يمكن قياسها بكثير من الدقة . وقد تساعد هذه القياسات فى الدراسات التصنيفية حيث تختلف البكتيريات فى أحجام خلاياها . وكذلك أيضاً تختلف البكتيريات المتجرثمة فى حجم جراثيمها حيث يعتبر قياسها من الدراسات التصنيفية الهامة . وقد يطرأ على النوع البكتيرى الواحد بعض الإختلافات أو التنوعات المورفولوجية والتى تنعكس على حجم خلاياه الخضرية أو على حجم جراثيمه الداخلية فى البكتيريات المتجرثمة .

ولتقدير حجم الخلية أو الجرثومة يقاس طول وعرض الخلية ، ويستعان فى ذلك بمقياس عيى Ocular micrometer يوضع بالعدسة العينية من الميكروسكوب. وهذاالمقياس تعاير أقسامه بالاستعانه بمقياس دقيق معروف ومثبت على شريحة خاصة يسمى Stage micrometer . يوضع على مسرح المجهر ، شكل ٣٥ (القسم الواحد منها يساوى ١٠ ميكرون) ، ثم تجرى المعايرة بالعدسة الشيئية .

خطوات العمل :

١ – إنزع العدسة العينية المركبة من الميكروسكوب إفصل الجزء العلوى منها ، ثم ضع الميكرومتر العيى بأنبوبتها وتأكد من إرتكازه على المكان المخصص له ، ثم أعد تركيب الجزء العلوى من العدسة فى مكانه .

٢ – ضع الشريحة الميكرومترية على مسرح الميكروسكوب ثم حاول ، مشاهدة تقسيماتها بالعدسة الصغرى (لاحظ أن تدريجاته توجد بداخل دائرة

سوداء) ثبت الشريحة بالماسكين ، ثم حرك القطعة الأنفية لتستعمل العدسة الكبرى . إستعمل الضابط الدقيق حتى ترى التقسيمات بوضوح .

٣ – ضع نقطة من زيت السيدر على الشريحة الميكرومترية ، ثم حرك القطعة الأنفية لتكون العدسة الزيتية فى وضع الإستعمال . حرك الضابط الدقيق حتى تشاهد أقسام تدريج الشريحة الميكرومترية بوضوح .

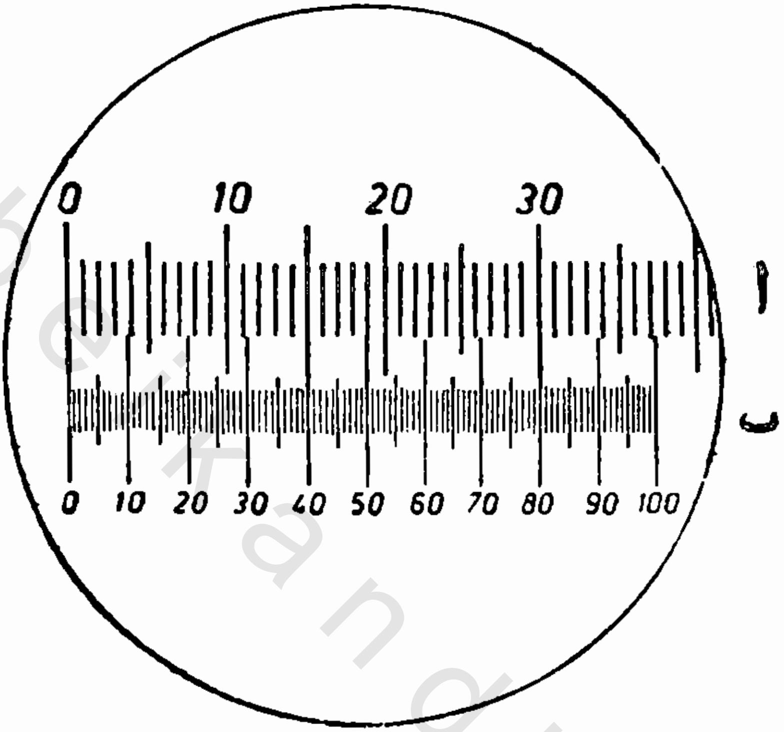
٤ – حدد منطقة من التدريج العينى تكون مساوية فى الطول ومقابلة لمنطقة من تدريج الشريحة الميكرومترية (يفضل أن يكون الخطان المنطبقان من كل من التدريجين أبعد مايمكن عن بعضهما) قدر عدد أقسام الميكرومتر العينى التى تقابل عدد من أقسام الشريحة الميكرومترية فى المناطق المتطابقة.وحيث أن القسم الواحد من أقسام تدريج الشريحة الميكرومترية يساوى ١٠ ميكرون . فبذلك يمكن تقدير طول القسم الواحد من أقسام الميكرومتر العينى باستعمال الشيئية المغمورة فى الزيت .

فمثلا إذا وجد أن ٩٠ قسم من الميكرومتر العينى تنطبق على ١٥ قسم من أقسام الشريحة الميكرومترية فان طول القسم الواحد من الميكرومتر العينى

$$\text{تساوى } \frac{١٥ \times ١٠}{٩٠} = ١,٦٧ \text{ ميكرون .}$$

٥ – إرفع الشريحة الميكرومترية ونظفها جيداً من زيت السيدر واحتفظ بها فى مكان أمين .

٦ – ضع الشريحة المصبوغة للبكتيريا *Bacillus subtilis* وضع عليها قليلا من زيت السيدر ، واستعمل العدسة الزيتية مع الضابط الدقيق حتى ترى الخلايا والجراثيم .



(شكل ٣٥) :
حقل ميكروسكوبى يبين طريقة معايرة الميكرومتر العينى بأقسام الشريحة الميكرومترية
ا - أقسام الشريحة الميكرومترية ب - أقسام الميكرومتر العينى

٧ - بواسطة الميكرومتر العينى قدر طول وعرض الخلايا الخضرية والجراثيم الداخلية . ثم أحسب متوسط الطول والعرض بالميكرون .

obeikandl.com

٨

التقدير الكمى للنمو البكتيرى

QUANTITATIVE MEASUREMETNS OF BACTERIAL GROWTH

علاوة على أن دراسة الصفات المزرعية والمظهرية للنموات البكتيرية تعتبر من الدراسات الوصفية الهامة ، إلا أن التقدير الكمى للنموات البكتيرية يعتبر أساسا لكثير من الدراسات الأساسية والتطبيقية . فمثلا تتخذ كمية النمو أساسا لتقدير تأثير كثير من المعاملات الفيزيائية أو الكيماوية على نمو البكتيريا وتكاثرها . كما تتخذ أساسا فى التقدير الحيوى للفيتامينات وبعض الأحماض الأمينية وفى قياس مدى نشاط الكائنات البكتيرية فى إحداث التغيرات الكيماوية لبعض مواد التفاعل المعينة وغير ذلك من الدراسات .

ولتقدير النمو تقديراً كميا دقيقا يوجد عديد من الطرق المختلفة فى أسسها والمتحدة فى أهدافها . ونظراً لاتساع مجال هذه الطرق فان ذلك يتيح للدارس الفرصة فى إتباع الطريقة التى تتناسب مع إمكانياته .

أولا – التقدير المباشر لعدد الخلايا Gell count

يمكن القيام بتقدير عدد الخلايا مباشرة فى عينة من المزرعة ، وذلك . بالإستعانة بالميكروسكوب وتتميز هذه الطريقة بسهولة إجرائها وسرعة ، الحصول على نتائجها ، إلا أنها طريقة مجهدة للنظر رغم أستعمال أغشية بكتيرية مصبوغة لسهولة رؤية الخلايا . هذا ، ومن الملاحظ أن العد المباشر للخلايا المثبتة والمصبوغة لايميز بين الخلايا الحية والأخرى غير الحية . ولإجراء ذلك توجد عدة طرق .

(أ) استعمال شرائح زجاجية خاصة

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة حديثة السن (٤٨ ساعة) من كل من *E. coli.* و *Bacillus subtilis* نامية فى بيئة مرق مغذى .

٢ — حضر شريحة بتروف هاوسر Petroff - Hausser أو شريحة قياسية لعد كرات الدم H aemocytometer وعدداً من أغطية الشرائح النظيفة . (تتميز هذه الشرائح بوجود حجرات صغيرة ذات حجم معين ، كما تحتوى على تقسيمات دقيقة بشكل مربعات) .

٣ — إسحب بواسطة ماصة مدرجة معقمة كمية من المزرعة البكتيرية بعد رجها جيداً وضع بواسطتها بضع قطرات على سطح الشريحة لتكفى لغمر حجرة العد بالشريحة ، ثم غطها مباشرة بغطاء شريحة نظيف .

٤ — إفحص الشريحة بالميكروسكوب — يفضل إستعمال طريقة الحقل المظلم . قدر عدد الخلايا فى حوالى ٢٠٠ مربع ، يراعى عند العد حساب الخلايا التى تتواجد فوق الضلعين المكونين للزاوية اليسرى فقط من المربع .

٥ — قدر متوسط عدد الخلايا بالمربع الواحد ومنها يمكن عن طريق عملية حسابية — تختلف باختلاف الشريحة المستعملة — تقدير عدد الخلايا فى ١,٠ مل من المزرعة البكتيرية المستعملة .

(ب) استعمال شرائح زجاجية عادية

١ — حضر مزرعة حديثة السن من كل من *E. coli, Bacillus subtilis* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٤٨ ساعة .

٢ — حضر شريحتين عاديتين نظيفتين . ضع كل منهما فوق قطعة من الورق رسم عليها مربع مساحته ١سم^{٢} بحيث يقع المربع فى منتصف الشريحة .

٣ – رج أحد المزارع البكتيرية جيداً ثم أنقل كمية ٠,٠١ مل فى وسط المربع بأحد الشرائح بواسطة ماصة معقمة ومدرجة سعة ٠,١ مل .

وبواسطة ماصة أخرى أنقل نفس الكمية من المزرعة الأخرى إلى وسط المربع فى الشريحة الثانية (يمكن نقل الكمية باستعمال إبرة زرع ذات عقدة سعتها ٠,٠١ مل) .

٤ – أفرد الكمية المنقولة على جميع مساحة المربع بكل شريحة بواسطة إبرة التلقيح المستقيمة المعقمة .

٥ – جفف الشريحة على سطح مستو دافىء بحيث يتم التجفيف خلال خمس دقائق . ثم ثبت الغشاء بالتسخين . (فى حالة تقدير عدد البكتيريا باللبن تؤخذ كمية متساوية من اللبن ويحضر منها غشاء مثبت ولكن يزال مايحتويه من دهن بتعريض الغشاء المثبت إلى الزيلول ثم يترك الغشاء ليجف . ثم يغمر بعدها بكحول الايثايل ٩٥ ٪ لمدة دقيقة ثم يترك الغشاء ليجف بالهواء) .

٦ – يصبغ الغشاء بصبغة أزرق الميثلين لمدة نصف دقيقه ثم تغسل الشريحة بالماء وتجفف .

٧ – إفحص عشرة حقول مجهرية مسجلا النتائج بطريقتين :

(ا) تقدير عدد جميع الخلايا بالحقل الواحد (المفردة والمتجمعة) .

(ب) تقدير عدد الخلايا المفردة فقط بكل حقل .

٨ – أحسب عدد الخلايا فى ١ مل من المزرعة الأصلية المختبرة ولإجراء ذلك تحسب أولا مساحة الحقل الميكروسكوبى على أساس المعادلة (ط نق٢) ويمكن قياس قطر الحقل بالاستعانة بالميكرومتر العينى المعاير . ولما كانت كمية المزرعة المستعملة ٠,٠١ مل وهى تنتشر فى مساحة ١ سم٢ فانه يمكن تقسيم هذه

المساحة على مساحة الحقل المجهرى فيمكن التعرف على عدد الحقول المجهرية فى مساحة الغشاء . ومن حاصل ضرب متوسط عدد الخلايا البكتيرية بالحقل الواحد× عدد الحقول المجهرية ، يمكن الحصول على عدد الخلايا فى كمية ٠٫١ مل من العينة المستعملة . وبضرب الناتج ×١٠٠ نحصل على عدد الخلايا فى ١ مل من المزرعة أو العينة المستعملة .

ثانيا – التقدير غير المباشر لعدد الخلايا

يمكن بهذه الطريقة تقدير عدد الخلايا الحية ذات القدرة على التكاثر تحت الظروف المناسبة لنموها . لذلك يجب أستعمال البيئة الغذائية المناسبة ، وتعرض المزرعة لظروف التحضين المثالية للنوع البكتيرى المراد تقدير عدد مستعمراته ، ويجرى ذلك باستعمال طريقة العد بالأطباق Plate count (شكل ٣٦) .

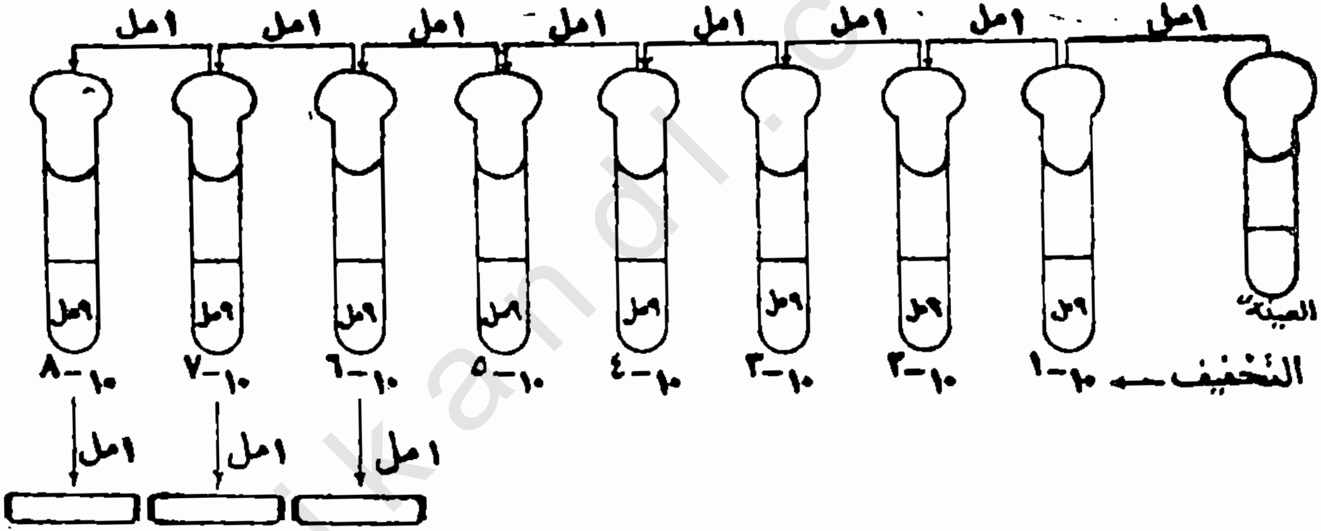
خطوات العمل :

١ – رج المزرعة البكتيرية النامية فى بيئة المرق المغذى جيداً لكى تتوزع بها الخلايا بانتظام. ثم أنقل ١ مل منها بواسطة ماصة معقمة إلى أنبوبة تحتوى على ٩ مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١ : ١٠ أى $١٠^{-١}$.

٢ – رج المعلق المخفف جيداً بالأنبوبة ثم انقل منها ١ مل بواسطة ماصة معقمة أخرى إلى أنبوبة تحتوى على ٩ مل ماء معقم أو بيئة معقمة لتحصل على تخفيف ١ : ١٠٠ أي $١٠^{-٢}$.

٣ – كرر الخطوة السابقة عدة مرات حتى تحصل على تخفيفات تصل إلى $١٠^{-٦}$ ، $١٠^{-٧}$ ، $١٠^{-٨}$ ، مستخدما ماصة معقمة فى كل مرة .

obeikandl.com



(شكل ٣٦) : رسم تخطيطي يبين الخطوات المتبعة لاجراء تقدير النمو على أساس عدد الخلايا ذات القدرة على التكاثر (طريقة العد بالاطباق Plate count)

obeikandi.com

٤ – انقل ١ مل من كل من التخفيفات الأخيرة 10^{-6} ، 10^{-7} ، 10^{-8} إلى طبق بترى معقم مع مراعاة تحضير طبقين لكل تخفيف .

٥ – أضف إلى كل طبق كمية كافية (لاتزيد عن ١٥ مل) من بيئة الآجار المغذى المسالة والمبردة إلى درجة ٤٥°م . اخلط محتويات كل طبق جيداً وذلك بتحريكه إلى الأمام وإلى الخلف عدة مرات ثم اتركه ليتصلب .

٦ – ضع الأطباق فى الحضان وهى فى وضع مقلوب على درجة ٣٧°م لمدة يومين :

٧ – انتخب التخفيف المناسب الذى يظهر عدد من المستعمرات يتراوح بين ٣٠ – ٣٠٠ مستعمرة بالطبق الواحد . إحسب متوسط عدد المستعمرات بالطبق الواحد .

٨ – احسب عدد الخلايا الحية فى ١ مل من المزرعة الأصلية وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات فى الطبق فى مقلوب التخفيف المستعمل به.

ثالثا – تقدير الوزن الجاف للخلايا

تقتضى بعض الدراسات تقدير النمو البكتيرى على أساس الوزن الجاف للخلايا باعتبار أن الخلية البكتيرية تحتوى على ٩٠ ٪ ماء وهذه النسبة تختلف تبعا للنوع البكتيرى . وعند تقدير الوزن الجاف للخلايا يجب التخلص من آثار البيئة النامية عليها بغسل الخلايا عدة مرات بالماء المقطر والمعقم .

خطوات العمل :

١ – جهز مزرعة من البكتيريا *E. coli* نامية فى بيئة مرق مغذى لمدة ٢٤ ساعة .

obeikandi.com

٢ - رج المزرعة جيداً ثم انقل منها كمية ١٠ مل إلى أنبوبة طرد مركزى نظيفة .

٣ - افصل الخلايا عن البيئة بتشغيل جهاز الطرد المركزى بسرعة ١٠,٠٠٠ لفة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق ، ثم تخلص من البيئة الرائقة فوق الخلايا.

٤ - أضف إلى الخلايا كمية ١٠ مل من ماء مقطر معقم ، رجها جيداً لغسل الخلايا ثم افصل الخلايا بالقوة المركزية الطاردة بنفس السرعة ونفس المدة مرة ثانية ثم تخلص من الراشح .

٥ - كرر الخطوة السابقة مرة أخرى ليتم غسيل الخلايا ثلاث مرات ، ثم أضف للخلايا المغسولة والمترسبة كمية ١٠ مل من الماء المقطر ورجها جيداً ثم أنقل أحجام موحدة منها (١ مل) إلى بواتق سبق تثبيت وزنها بعيداً عن الرطوبة .

٦- جفف العينات المأخوذة فى فرن الهواء الساخن على درجة ١١٥°م لمدة ١٢ ساعة .

٧ - إحسب وزن الخلايا الجاف فى المزرعة المستعملة وذلك على أساس عدد المليجرامات فى كمية ٠,١ مل من المزرعة .

رابعا - تقدير الآزوت الكلى بالخلايا .

تعتمد هذ الطريقة على أن غالبية الخلايا البكتيرية تتكون من البروتين وحيث أن الآزوت هو أهم مكونات البروتين فان تقدير الآزوت الكلى بالمزرعة أو بعينة منها يكون متلازما مع كمية النمو (عدد وحجم الخلايا) . وعادة تقدر نسبة النيتروجين بالبروتين البكتيرى بحوالى ١٤ ٪ من الوزن

الجاف للبروتوبلازم ، هذا ويجب أن نعلم أن هذه النسبة ليست ثابتة للأنواع البكتيرية المختلفة وحتى فى النوع الواحد تحت مختلف الظروف البيئية .

خطوات العمل :

١ — حضر معلق من الخلايا المغسولة وذلك باستعمال القوة المركزية الطاردة ثلاث مرات مع الغسيل بالماء المقطر المعقم فى كل مرة .

٢ — ضع ٢ مل معلق الخلايا المغسولة فى دورق كلداهل الدقيق سعة ٣٠ مل ، ثم أضف إليه ٢ مل من مزيج هضم البروتينات .

٣ — سخن محتويات الدورق حتى يتم ترويق المحلول ثم استمر فى الغليان الهادىء لمدة ساعة . بعد ذلك اترك المحلول ليبرد .

٤ — أضف ٥ مل من محلول مركز من ص ا يد (١٠ أساسى) ثم أضف إلى المزيج كمية كافية من مادة مانعة للرغوة مثل حمض الأوليك أو مادة السليكون .

٥ — أوصل الدورق فى الحال بجهاز تقطير صغير متصل بأنبوبة استقبال مدرجة تحتوى على ٢ مل حمض كبرتيك $\frac{١}{٢٠}$ أساسى مع مراعاة غمر أنبوبة التوصيل أسفل سطح الحمض فى أنبوبة الإستقبال .

٦ — سخن للغليان لمدة ٥ دقائق ثم إرفع أنبوبة التوصيل فى الدقيقة الأخيرة من الغليان فوق سطح الحمض .

٧ — خفف المحلول الناتج بكمية معلومة من الماء المقطر بحيث يحتوى المخلوط الناتج على ١٠ — ١٥ ميكروجرام آزوت فى المللیلتر الواحد تقريباً .

٨ — أضف إلى كمية ٢ مل من السائل المخف كمية مساوية (٢ مل)

obeikandi.com

من محلول نسلر Nessler solution و٣ مل من محلول ص ا يد (٢ أساسى) وذلك فى أنبوبة قياس اللون .

٩ – أترك الأنابيب لمدة ١٥ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة ثم قس درجة التلوين باستعمال جهاز تقدير الألوان Colorimeter مستخدما موجة ضوئية ذات طول ٤٤٠ nm .

١٠ – قدر آزوت الأمونيا بالمليجرام / ١ مل من المزرعة البكتيرية مستخدما فى ذلك الرسم البيانى القياسى السابق تجهيزه باستعمال محاليل من الأمونيا معروف محتوياتها من الآزوت .

خامسا – تقدير درجة التعكير Turbidimetry

تعتمد هذه الطريقة على أنه كلما زادت درجة تعكير المزرعة (زيادة كمية النمو) كلما قلت كثافة الأشعة الضوئية النافذة خلال هذه المزرعة . فاذا استعمل جهاز لقياس الضوء النافذ خلال مزرعة بكتيرية سائلة أو معلق بكتيرى فى ماء مقطر فانه يمكن قياس كثافة الشعاع النافذ باستعمال وحدة ضوئية حساسة ويلاحظ أن كثافة الشعاع تكون متلازمة عكسيا مع درجة تعكير المزرعة. ويستعمل لذلك أجهزة خاصة تقيس درجة عكارة المزارع والمحاليل تعرف باسم Turbidimeters .وطرق قياس درجة التعكير من أكثر الطرق المتبعة فى قياس النمو البكتيرى كميا وذلك لسرعتها ودقتها إلا أنه يصعب اتباع هذه الطريقة فى حالة الخلايا الملونة بدرجة كبيرة أو التى تفرز صبغات البيئة بدرجة واضحة ، وفى الحالة الأخيرة قد تستعمل طرق قياس بصرية أخرى مثل Colorimetry أو Spectrophotometry ، وفى كل حالة يراعى إختيار الموجة الضوئية المناسبة لكل نوع بكتيرى وهى الموجة التى تكون فيها

درجة امتصاص الخلايا أو المحلول أو المعلق المستعمل أكبر مايمكن وتحـدد هذه الموجات أولا بتعريض المعلق لعدة موجات ضوئية وذلك باستعمال مرشحات ضوئية مختلفة .

خطوات العمل :

١ – حضر مزرعة حديثة من البكتيريا *E. coli* نامية فى بيئة سائلة

٢ – املأ أحد الأنابيب الخاصة بجهاز قياس الضوء Colorimeter بالمزرعة بتخفيف معلوم منها بعد رجها جيداً ، إملأ أنبوبة أخرى بالبيئة المستخدمة فى تنمية البكتيريا المراد تقدير نموها .

٣ – فى حالة استعمال بيئة عديمة اللون يستعمل مرشح ضوئى يعطى موجات ضوئية بطول ٤٢٠ nm ، أما فى حالة استعمال بيئة صفراء أو بنية اللون يستعمل مرشح ضوئى يوفر موجات بطول ٦٠٠ nm

٤ – دون قراءات الكثافة الضوئية للمزرعة Optical density وهذه القراءات تكون متلازمة طردياً مع درجة تعـكير البيئة ، وتبعا لقـانون Lambert&Beer فإن الكثافة الضوئية للمزرعة = ٢ – لو غاريتم النسبة المئوية لدرجة نفاذية الضوء Transmittance٪ ، خلال المزرعة .

سادسا – تقدير درجة انتاج الحمض بالمزرعة

يقدر النمو كميا عن هذا الطريق عادة فى بكتيريا حمض اللاكتيك وغيرها من البكتيريات التى تتميز بانتاج أحماض أثناء نموها بدرجة تكفى لقياسها .

خطوات العمل :

١ ــ حضر عدة مزارع من البكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* ونامية في بيئية اللبن لمدة ١٢ ، ٢٤ ، ٤٨ ساعة .

٢ ــ انقل ١٠ مل من كل مزرعة إلى دورق مخروطي نظيف ، أضف إليها عدة نقط من دليل الفينولفثالين .

٣ ــ عادل حموضة العينة باستعمال محلول ص ا يد $\frac{١}{١٠٠}$ أساسي .

٤ ــ احسب عدد ملليلترات ص ا يد المستعملة وهي عادة تتناسب طردياً مع درجة حموضة المزرعة المختبرة .

obeikandl.com

العوامل البيئية وتأثيرها على البكتيريا

هناك عديد من العوامل البيئية المختلفة التى تؤثر على نمو وتأقلم البكتيريا فى بيئاتها الطبيعية . وهذه العوامل قد تكون فيزيائية Physical أو كيماوية Chemical أو حيوية Biological حسب طبيعة العامل المؤثر . إلا أنه يجب أن نعلم أن تأثير هذه العوامل قد يكون متداخلا لدرجة يصعب منها تحديد طبيعة العامل المؤثر . كما أن النمو البكتيرى قد يتأثر بأكثر من عامل واحد فى نفس الوقت

وفيما يلى بيان لبعض الطرق القياسية المتبعة للتعرف على درجة تأثير النمو البكتيرى بهذه العوامل البيئية كل على انفراد وذلك من الناحية النوعية أو الكمية

أولا — العوامل الفيزيائية

تشمل العوامل التى تستند على أسس فيزيائية مثل الحرارة ، الاشعاع ، الضغط الأسموزى ، الجفاف ، تركيز أيون الإيدروجين ، التوتر السطحى ، التهوية .

١ — تأثير الحرارة

تعتبر درجة الحرارة من أهم العوامل المؤثرة على النمو البكتيرى . فمن المعروف أن البكتيريات تختلف فى متطلباتها من الحرارة ، فيتميز كل نوع بكتيرى بدرجة حرارة مثالية Optimum وهى الدرجة التى يكون نموه عندها أكثر ما يمكن ، ودرجة حرارة دنيا Minimum وهى أقل درجة من الحرارة يمكن الكائن البكتيرى أن ينمو ويتكاثر عليها ، وأى انخفاض فى الحرارة عن هذه الدرجة يؤدى إلى توقف النمو والتكاثر ، وأيضا درجة حرارة

عظمى Maximum ، وهى أعلى درجة من الحرارة يمكن للكائن أن ينمو ويتكاثر عليها . وإذا ما ارتفعت الحرارة عن الدرجة القصوى يتوقف النمو والتكاثر كلية .

ويعتبر تقدير هذه الدرجات الثلاث لكل نوع بكتيرى من التقديرات الهامة والمفيدة فى أغراض التعرف والتصنيف ، إذ عن طريقها يمكن تقسيم البكتيريات إلى ثلاث مجاميع : بكتيريات محبة للحرارة المرتفعة Thermophilic وبكتيريات محبة للحرارة المتوسطة Mesophilic وبكتيريات محبة للحرارة المنخفضة Psycrophilic .

(١) تقدير درجة الحرارة المثالية لبعض البكتيريات :

١ - لقح أربع أنابيب آجار مغذى مائل بكميات متساوية من مزرعة البكتيريا *E.coli* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة .

٢ - لقح أربع أنابيب أخرى بكميات متساوية من مزرعة البكتيريا *Bacillus Subtilis* بنفس العمر .

٣ - لقح أربع أخرى بكميات متساوية من البكتيريا *Bacillus staerothermohilus* .

٤ - قسم الأنابيب جميعها إلى أربع مجاميع ، كل مجموعة تحتوى على ثلاث أنابيب (أنبوبة لكل نوع بكتيرى) .

٥ - ضع مجموعة فى حضان على درجة ٥٥°م ، ومجموعة أخرى فى حضان على درجة ٣٧°م ، والمجموعة الثالثة على درجة حرارة الغرفة ، والمجموعة الرابعة على درجة حرارة ٥°م ، واتركها لمدة ٢٤ ساعة .

٦ - افحص المزارع فى كل مجموعة ، ولاحظ ما بها من نمو وقدر كميته ودونها فى جدول مستعينا بالمقاييس التالية :

— = لايوجد نمو	+ = نمو ضعيف
++ = نمو جيد	+++ = نمو ممتاز

(ب) تقدير معدل موت الخلايا البكتيرية نتيجة لارتفاع الحرارة :

عادة يقوم المشتغلون بالدراسات البكتيريولوجية بتقدير درجة الحرارة المرتفعة التى تقتل عندها خلايا نوع بكتيرى معين عندما تتعرض لها لمدة عشر دقائق، وعادة يطلق على هذا التقدير درجة الحرارة المميته Thermal death point. أو يقومون بتقدير الوقت اللازم لقتل خلايا نوع بكتيرى معين عند تعريضها إلى درجة معينة من الحرارة المرتفعة ، ويطلق على هذا التقدير الوقت الحرارى المميت Thermal death time .

وحيث أنه لا يمكن لكل الخلايا الموجودة بالمزرعة أن تموت فى وقت واحد على درجة الحرارة المستعملة فى حالة التقدير الأول ، أو بعد التعرض لفترة معينة على درجة ثابته فى حالة التقدير الثانى . فان هذين التقديريـــن ليسا من التقديرات الدقيقة . وبخاصة إذا ما علمنا مدى تأثر هما ببعض العوامل البيئية الأخرى مثل درجة تركيز أيون الإيدروجين بالمزرعة ، وكثافة المعلق البكتيرى المستعمل . لذلك فيستعاض عنهما بتقدير ما يعرف بمعدل الوقت الحرارى Thermal death rate وهو أقل عدد من الخلايا الحية الذى يوجد فى المزرعة عقب تعريضها لدرجة حرارة معينة لمدة عشر قائق ولإجــراء ذلك يتبع مايأتى :

١ — ضع ١ مل من مزرعة البكتيريا *E. coli* النامية لمدة ٢٤ ساعة فى كل من ٥ أنابيب اختبار معقمة وفارغة .

٢ — جهز حمام مائى وارفع حرارته إلى درجة ٤٥°م ثم ضع به أحد الأنابيب لمدة ١٠ دقائق . ثم صب محتويات الأنبوبة فى طبق بترى معقم .

٣ — إرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٠°م ثم عرض لها الأنبوبة الثانية لمدة ١٠ دقائق ثم فرغ محتوياتها فى طبق بترى معقم .

٤ — إرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٥٥°م وكرر نفس الشىء مع الأنبوبة الثالثة .

٥ — إرفع درجة حرارة الحمام المائى إلى درجة ٦٠°م وكرر نفس الشىء مع الأنبو بة الرابعة .

٦ — فرغ محتويات الأنبوبة الخامسة فى طبق بترى معقم دون تعريضها إلى معاملة حرارية للمقارنة .

٧ — أسل كمية من بيئة الآجار المغذى والمعقمة والمبردة إلى درجة ٤٥°م ثم صب كميات متساوية منها فى أطباق بترى المستعملة. اخلط البيئة مع اللقاح جيداً بتحريك الطبق عدة مرات .

٨ — عقب تصلب الآجار ، ضعها بالحضان على درجة ٣٧° م لمدة ٤٨ ساعة .

٩ — قدر عدد المستعمرات التى تظهر بكل طبق ودونها فى جدول منظم ثم دونها بشكل رسم بيانى مع استعمال لوغاريتم أعداد المستعمرات .

٤ — تأثير الإشعاع

بعض الإشعاعات مثل الأشعة فوق البنفسجية والأشعة السينية القصيرة وكذلك أشعة جاما والأشعة الجزيئية (الناتجة عن الألكترونات سريعة الحركة)

وغيرها من الإشعاعات ، لها تأثير ضار ومميت للبكتيريا . ولعل الأشعه فوق البنفسجية والأشعة السينية هى أكثر الإشعاعات دراسة فى هذا الصدد ، فالأشعة فوق البنفسجية مثلا ليست سامة فقط لخلايا البكتيريا بل أنها تعمل أيضاً على تكوين مواد سامة للخلايا البكتيرية فى بيئات الزرع الملقحة أو غير الملقحة عندما تعرض لها هذه البيئات. والتمرين التالى يبين تأثير هذا النوع من الأشعة على مزارع البكتيريا . فقد يكون التأثير المميت على الخلايا البكتيرية نفسها أو نتيجة لفعل الأشعة على بيئة الزرع أو بكلا الطريقين .

خطوات العمل :

١ – لقح أنبوبتين من الآجار المغذى المسال والمبرد على درجة ٤٥°م أحدهما بالبكتيريا *E.coli* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٢٤ ساعة) ، والأخرى بالبكتيريا *Bacillus subtilis* (ملء عقدة من مزرعة بعمر ٧٢ ساعة) اخلط اللقاح جيداً بالآجار بكل أنبوبة .

٢ – صب محتويات كل من الأنبوبتين فى طبق بترى معقم واتركها لتتصلب .

٣ – احضر قطعتين من الورق الأسود واقطع بها شكلا معينا وليكن أول حرف من اسمك .

٤ – ارفع غطاء كل من الطبقين وغطه بقطعة الورق الأسود جيداً مع إحكام التغطية برباط من الخليط .

٥ – عرض الأطباق لمصباح يشع موجات الأشعة فوق البنفسجية لمدة ½ ساعة .

٦ - بعد مرور الوقت اللازم ارفع الورق الأسود وغط الأطباق بأغطيتها الزجاجية ، ثم ضعها بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٧ - قارن عدد المستعمرات فى المناطق المعرضة للضوء وتلك التى لم تعرض ودون نتائجــك .

ويمكن تعريض بيئة غير ملقحة بعد تغطيتها بقطعة من الورق الأسود ذات الأشكال المعينة ثم لقح بعد ذلك بالبكتيريا وتحضن للتعرف على تأثير الأشعة عــلى البيئة نفسها فى المناطق المعرضة .

٣ - تأثير الضغط الاسموزى

عندما تتواجد الخلايا البكتيرية فى محلول ذو ضغط اسموزى مرتفــع (تركيز المواد الذائبة به أعلى منها بداخل الخلايا) فان الخلية تفقد محتوياتها المائية تدريجيا وتنكمش محتوياتها الخلوية بعيداً عن الجدار الخلوى ، وتعرف الخلية حينئذ بأنها فى حالة بلزمة Plasmolysis ، أما إذا حدث العكس ووجدت الخلايا فى بيئة ذات ضغط اسموزى منخفض (تركيز المواد الذائبة به أقل منه بداخل الخلية) فان الخلية تمتص الماء تدريجيا وتزداد محتوياتها المائيــة . وتعرف الخلية حينئذ بأنها فى حالة انتفاخ Swelling ، والعملية تعــرف Plasmoptysis وإذازاد الانتفاخ قد تنفجر الخلايا وتموت . وبخلاف الخلايا النباتية والحيوانية فان البكتيريا ليست حساسة للتغيرات البسيطة فى درجة الضغط الإسموزى للبيئة النامية عليها ولكن إذا زادت هذه التغييرات بدرجة كبيرة أثر ذلك على الخلايا البكتيرية . وتختلف البكتيريات فى درجة تحملها للضغوط الأسموزية المرتفعة ، الأمر الذى أدى إلى تقسيمها إلى بكتيريات محبة للملوحة المرتفعة Halophilic وأخرى غير محبة للملوحة المرتفعة Nonhalophilic .

ويجب أن نذكر هنا أن بعض الدراسات البكتيريولوجية قد تتطلب استعمال خلايا مبلزمة كما يحدث عند صبغ ودراسة الغشاء السيتوبلازمى للخلايا البكتيرية .

خطوات العمل :

١ — ضع كمية ١ مل من محلول سكر القصب (السكروز) ٤٠ ٪ فى كل من أنبوبتين معقمتين وفارغتين .

٢ — أضف كمية ١ مل من محلول السكروز ٤٠ ٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من الأنبوبتين ليصبح تركيز السكر بهما ٤ ٪ .

٣ — كرر العملية ولكن بوضع ١ مل من محلول سكر السكروز ٤ ٪ إلى ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى كل من أنبوبتين أخرتين ليصبح تركيز السكر بهما ٤, ٪ .

٤ — كرر نفس الخطوات الثلاث السابقة باستعمال محلول كلوريد الصوديوم ٢٧ ٪ لتحضير مجموعتين من التركيزات المتسلسلة تبدأ من ٢٧ ٪ ثم ٢,٧ ٪ وينتهى ٠,٢٧ ٪ .

٥ — صب فى ستة أطباق بترى بيئة آجار مغذى مسال ومبرد لدرجة ٤٥°م ثم اتركه ليتصلب .

٦ — اقلب الأطباق وقسم قاعدتها إلى ٦ أقسام بواسطة قلم شمع .

٧ — ضع الأنابيب الست السابق تجهيزها مرتبة تبعا لتركيزاتها ثم لقح أنابيب مجموعة واحدة من مجاميع السكروز أو ملح الطعام بمزرعة من البكتيريا *E. coli* بعمر ٢٤ ساعة ، ثم لقح أنابيب المجموعتين الأخرتين بمزرعة من البكتيريا *Bacillus subtilis* بعمر ٧٢ ساعة .

٨ — لقح كل جزء من أجزاء أحد أطباق بترى المعلمة مباشرة بعد الخلط بلقاح كل أنبوبة المكونة لكل مجموعة .

٩ — كرر نفس العمليات بعد مرور ساعة على وضع الخلايا فى المحاليل السكرية والملحية .

١٠ — كرر نفس الخطوات السابقة ولكن بعد مرور ٢٤ ساعة من خلط الخلايا فى المحاليل السكرية والملحية . .

١١ — دون النتائج فى جدولين . جدول خاص بالمحاليل السكرية . والآخر بالمحاليل الملحية .

٤ — تأثير الجفاف The effect of desiccation

لا يمكن للكائنات الحية الدقيقة أن تواصل نموها وتكاثرها تحت ظروف الجفاف الشديدة . وخلايا البكتيريا كما سبق أن ذكرنا شأنها شأن الخلايا النباتية يجب أن تحصل على غذائها فى صورة ذائبة فى الماء إذ يشترط إذن لنموها أن تتوفر لها الرطوبة بدرجة كافية. وعندما تجف البيئة ومامحتويها من الخلايا نفسها على ضغط الجو العادى ، فان ذلك يدعو إلى توقف النمو الذى يعقبه الموت . ومعدل موت الخلايا نتيجة للجفاف قد يتأثر تبعاً لتغير بعض العوامل الأخرى . فمثلا إذا تم تجفيف الخلية عن طريق تجميدها فى جو مفرغ من الهواء فان ذلك من شأنه حماية الخلية من الموت ، واذا استمرت ظروف التفريغ هذه لمدة طويلة فان ذلك يؤدى إلى إحتفاظ بعض الخلايا المعاملة بهذه الطريقة بحيويتها لمدد طويلة جداً . وتعرف عملية التجفيف والتبريد تحت الفراغ باسم Lyophilization وهى من الطرق الحديثة المعتادة فى حفظ مزارع الكائنات الحية . أما إذا جففت الخلايا دون تجميدها أولا فان ذلك يؤدى إلى

زيادة تركيز بروتو بلازم الخلايا ، وهذا يعرض الخلايا وهى على هذه الحالة إلى عمليات البلزمة التى تؤدى بها إلى الموت السريع نظراً لقلة محتوياتها من الرطوبة .

خطوات العمل :

١ – عقم ثمانيةأغطية شرائح نظيفة ، وذلك بطريقة التلهيب الكحولى عدة مرات ، ثم ضع كل أربعة منها فى طبق بترى معقم .

٢ – انقل نقطة صغيرة من مزرعة البكتيريا *E. coli* (٢٤ ساعة) إلى مركز أغطية الشرائح فى أحد الأطباق ، وأنقل نقطة صغيرة من مزرعة *Bacillus subtilis* (٧٢ ساعة) إلى مركز الأغطية فى الطبق الآخر .

٣ – ضع الأطباق فى كل الحضان واترك النقط لتجف بداخل الطبق

٤ – بواسطة ملقط معقم ، أنقل غطاء شريحة واحد بعد أن يجف ماعليه إلى طبق بترى معقم ثم صب عليه كمية من بيئة الآجار المغذى بعد إسالتها وتبريدها لدرجة ٤٥°م ، رج محتويات الطبق جيداً .

٥ – ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧°م .

٦ – اترك باقى الأغطية فى أطباقها بداخل الحضان لمدة ٤٨ ساعة ، ثم انقل غطاء واحد منها وأجر عليه ماأجريته فى الخطوة رقم (٤) ، كرر العملية كل ٤٨ ساعة .

٧ – قدر عدد المستعمرات التى تظهر على سطح بيئة الآجار .

٨ – دون النتائج المتحصل عليها فى جدول منظم .

٥ – تأثير تركيز ايون الايدروجين Effect of H - ion concentration

يتأثر النمو البكتيرى بدرجة كبيرة بالتغيرات فى تركيز ايون الإيدروجين بالبيئة النامى عليها ، وكما هو الحال من ناحية المتطلبات الحرارية ، فان لكل نوع بكتيرى درجة مثالية Optimum من تركيز أيون الإيدورجين يكون النمو عندها أكبر مايمكن ، كما أن له درجة عظمى Maximum وهى أقصى درجة يحدث عندها نمو ، وأن أى زيادة فى تركيز أيونات الأيدروجين عن هذه الدرجة تمنع النمو . وكذلك نجد أيضاً أن لكل نوع بكتيرى درجة دنيا Minimum ،وهىالدرجةالتى إذا انخفض عنها تركيز أيون الإيدروجين يتوقف النمو كلية ، ويجب أن نعلم أن هذه الدرجات الثلاث من تركيز أيون الإيدروجين والخاصة بكل نوع بكتيرى ليست ثابتة ، بل تتأثر كثيراً بعوامل عديدة منها ، درجة الحرارة وتركيب البيئة ، والضغط الأسموزى ،وعموماً فان البكتيريا فيما عدا عدد قليل منها تتطلب تركيز متوسط من أيون الإيدروجين بمعنى أنها تتطلب بيئات متعادلة .

خطوات العمل :

١ – حضر المحاليل الآتية : محلول ٢ , ٠ جزيئى من فوسفات ثنائى البوتاسيوم ، ومحلول ١ , .جزيئى من حمض الستريك ، ومحلول ٢ , . جزيئى حمض بوريك ومحلول ٢ , ٠ جزيئى ص ا يد .

٢ – جهز مجموعة من المحاليل المختلفة فى قيمة الـ pH وذلك بخلط كميات من المحاليل السابقة طبقاً للنظام المبين بالجدول (٧) .

٣ – عقم الأنابيب المحتوية المختلفة فى درجة الـ pHفى معقم أرنولد بطريقة التعقيم المتقطع .

٤ – لقح كل أنبوبة بلقاح من مزرعة *E. coli* عمرها ٢٤ ساعة .

٥ – ضعها فى حضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٦ – لاحظ النمو بتقدير كمية التعكير التى تحدث بالبيئة دون رجهـا .

٧ – دون ملاحظاتك فى جدول مبيناً درجة التعكير مستعيناً بالقياسات التالية :

– = لايوجد عكارة   + = عكارة خفيفة

++ = عكارة متوسطة   +++ = عكارة شديدة

(جدول ٧) : طريقة تحضير بيئات زرع متدرجة فى تركيز أيون الإيدروجين .

فوسفات ثنائى البوتاسيوم ٢,٠ جزيئى (سم٣)	حمض السِّتريك ٠,١ جزيئى (سم٣)	بيئة مرق مغذى (سم٣)	الحجم الكلى (سم٣)	قيمة الـ pH بالتقريب
٠,٣	١,٧	٨	١٠	٢,٨
٠,٦	١,٤	٨	١٠	٣,٦
٠,٩	١,١	٨	١٠	٤,٤
١,١	٠,٩	٨	١٠	٥,٢
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٦,٠
١,٥	٠,٥	٨	١٠	٦,٨
١,٩	٠,١	٨	١٠	٧,٦
حمض بوريك ٠,٢ جزيئى (سم٣)	**صودا كاوية ٠,٢ جزيئى (سم٣)**	**بيئة مرق مغذى (سم٣)**	**الحجم الكلى (سم٣)**	**قيمة ألـ pH بالتقريب**
١,٧	٠,٣	٨	١٠	٨,٤
١,٣	٠,٧	٨	١٠	٩,٢
١,٠	١,٠	٨	١٠	١٠,٠

٦ - تأثير التوتر السطحى Effect of surface tension

بعض البكتيريات تنمو على البيئات السائلة مكونة غشاء منتظم أو متقطع فوق سطح البيئة ، وتعرف هذه البكتيريات بالمكونة لنمو غشائى Pellicle growth ومن المعروف أن هذه المجموعة من البكتيريات تكون هوائية إجباراً أو هوائية إختياراً . والنمو السطحى هذا يكون عادة معتمداً على قوة توتر سطح البيئة فاذا خفضت هذه القوة بأى طريقة من الطرق فان النمو لا يحدث على صورة غشاء بل يظهر مختلطاً ومنتشراً بالبيئة .

خطوات العمل :

١ - حضر ثلاث أنابيب تحتوى كل منها على ١٠ مل بيئة مرق مغـذى ورقمها بقلم شمع ١ ، ٢ ، ٣ .

٢ - لقح الأنابيب الثلاث بمزرعة أجار مائل البكتيريا *B. subtilis* بعمر ٢٤ ساعة .

٣ - أترك الأنبوبة رقم واحد كما هى ثم أضف إلى الأنبوبة رقم ٢ كمية ٠,٥ سم٣ من مادة رسينوليات الصوديوم Sodium ricinoleate أو أى مادة خافضة للتوتر السطحى مثل مادة الترايتون ب Triton B. 1956 بعد تخفيفه بنسبة ١ : ١٠٠٠ وللأنبوبة رقم ٣ كمية ١ سم٣ من نفس المادة ، رج الأنابيب جيداً .

٤ – ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥ – اختبر طبيعة النمو على الأنابيب الثلاث ، ودون نتائجك وملاحظاتك

٧ – تأثير التهوية :

تتطلب معظم الكائنات الدقيقة توفر الأكسجين لنموها وتكاثرها وتعرف بالكائنات الهوائية اجباراً Strict aerobes . إلا أن بعضاً آخر منها يمكنه أن ينمو ويتكاثر فى وجود أو غياب الإكسجين وهذه تعرف بالكائنات غير الهوائية اختياراً Facultative anaerobes كما أن هناك مجموعة أخرى من الكائنات يمتنع نموها كلية إذا ماتعرضت لتركيزات منخفضة من الاكسجين بمعنى أنها تتسمم فى وجوده وتعرف بالكائنات غير الهوائية إجباراً Strict anaerobes كما توجد مجموعة من البكتريا تتطلب ضغطا منخفضاً من الاكسجين وتسمى با Microaerophilic .

وهناك عدة طرق لاختبار مدى حاجة الكائنات البكتيرية من الأكسجين وقد تفيد بعض من هذه الطرق أيضا فى عزل الكائنات غير الهوائية فى مزارع نقية . وفيما يلى وصفا لطريقتين منها :

(ا) طريقة الاجار العميق

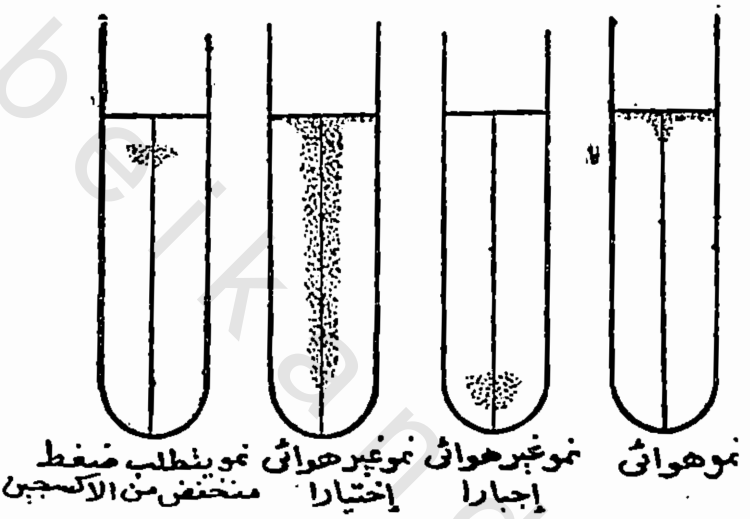
خطوات العمل :

١ – إغمس إبرة تلقيح مستقيمة معقمة فى معلق مائى لتربة زراعية .
٢ – أوخز بها بيئة آجار الجلوكوز العميق ، سبق إسالتها وتصلبها وذلك لطرد ماقد يكون مختلطا بها من هواء .

٣ – ضع الأنابيب بالحضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة ، ثم افحص

obeikandi.com

الأنابيب ولاحظ النمو البكتيرى الناتج على طول خط الوخز مستعينا بالحالات المبينة بشكل ٣٧ .



(شكل ٣٧) الحالات المختلفة لنمو البكتيريا بالآجار العميق .

(ب) طريقة حمض البيروجاليك

خطوات العمل :

١ ـ لقح آجار جلوكوز مائل بمعلق التربة الزراعية السابق استعماله أو بالنمو غير الهوائى الناتج فى قاع أنبوبة الآجار العميق .

٢ ـ قص الزائد من السدادة القطنية لأنبوبة الآجار المائل الملقح بواسطة مقص ، ثم إدفع ماتبقى منها بداخل الأنبوبة حتى تصل إلى قرب حافة الآجار المائل .

٣ ـ أضف إلى الجزء العلوى من الأنبوبة (فوق السدادة القطنية) كمية من

مسحوق حمض البيروجاليك ثم أضف إليها كمية من محلول الصودا الكاوية بتركيز ٤ ٪ ثم اقفل الأنبوبة باحكام بسدادة مطاط واقلب الأنبوبة مباشرة حتى لا يتسرب محلول الصودا الكاويـــة إلى سطح الآجار (شكل ٣٨) .

٤ – ضع الأنابيب وهى مقلوبة بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥ – لاحظ نمو المستعمرات غير الهوائية .

ثانيا – العوامل الكيماوية

(شكل ٣٨) : طريقة حمض البيروجاليك لتوفير الظروف غير الهوائية .

يقصد بالعوامل الكيماوية تلك التى تستند إلى أسس كيماوية وتؤثر على النمو البكتيرى إما بإيقافه بصفة مؤقته Bacteriostatic أوبصفـة دائمة Batericidal ومن أمثلة هذه العوامل التركيزات المختلفة من أيونات المعادن الثقيلـة وكذلك الأصباغ وبعض المواد الأيضية السمة التى عندما يزداد تركيزهـا بالمزرعة يتوقف النمو كلية . وكما سبق أن ذكرنا ، أن بعض العوامل الفيزيائية والحيوية تحدث فعلها الضار للبكتيريا عن طريق كيماوى كما يحدث عند افراز بعض الكائنات أثناء نموها مواد كيماوية سامة لغيرها من الكائنات .

١ – تأثير المعادن الثقيلة

يعرف فعل المعادن الثقيله على النمو البكتيرى باسم الفعل الأليجوديناميكى Oligodynamic action ، فهناك بعض المعادن الثقيلة التى عندماتوجد فى

تركيزات منخفضة يكون فعلها ساما على البكتيريات . ولبيان هذا التأثير تجرى خطوات العمل التالية :

١ — أسل كمية صغيرة من بيئة الآجار المغذى فى دورق مخروطى واتركها لتبرد إلى درجة حرارة ٤٥°م .

٢ — لقح البيئة باضافة ٠,١ مل من مزرعة البكتيريا *E. coli* والنامية لمدة ٢٤ ساعة على بيئة المرق المغذى ورجها جيداً .

٣ — صب البيئة الملقحة فى عدة أطباق بترى معقمة واتركها لتتصلب .

٤ — ضع على سطح الآجار ، بأحد الأطباق ، عمله نحاسية أو برونزية ثم ضع بطبق آخر عمله فضية وبطبق ثالث مسمار حديدى .

٥ — أترك الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٢٤ ساعة .

٦ — لاحظ المناطق الخالية من النمو البكتيرى حول العملة والمسمار الحديدى ، والتى يطلق عليها المناطق الإليجوديناميكية Oligodynamic zones.

٧ — لاحظ غزارة النمو البكتيرى على حواف هذه المناطق الخالية من النمو ، وذلك يرجع إلى أن التركيزات الضئيلة جداً من المعادن الثقيلة والتى تصل إلى حواف المنطقة العديمة النمو لها على العكس ، فعلا منشطا للنمو البكتيرى .

٨ — لاحظ أن البكتيريا تنمو نمواً عاديا فى باقى أجزاء الطبق .

٢ — تأثير الصبغات

للتركيزات المنخفضة من صبغة الكريستال فيوليت تأثير موقف لنمو البكتيريات الموجبة دون السالبة لتفاعل جرام . إذن فالتأثير الموقف للنمو

فى هذه الحالة تأثير اختيارى . وبغض النظر عن بعض الحالات الشاذة فان هذا التأثير يتلازم باستمرار مع إيجابية البكتيريات لتفاعل جرام . وبمعنى آخر فان البكتيريات الموجبة لتفاعل جرام تكون دائما حساسة لفعل التركيزات المنخفضة من هذه الصبغة فى حين أن البكتيريات السالبة لجرام تكون مقاومة للفعل الضار لهذه التركيزات .

خطوات العمل :

١ ـ حضر محلول بتركيز ١ : ١٠٠ من صبغة الكريستال فيوليت فى ماء مقطر

٢ ـ أضف ١ مل من المحلول السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم فى أنبوبة فيصبح تركيز الصبغة ١ : ١٠٠٠ . بنفس الماصة انقل ١,٠ مل من هذا التخفيف إلى طبق بترى معقم ونظيف .

٣ ـ انقل ١,٠ مل من محلول الصبغة بالتركيز السابق إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١ : ١٠,٠٠٠ ثم انقل بنفس الماصه ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم .

٤ ـ انقل ١ مل من محلول الصبغة بالتركيز الأخير إلى أنبوبة محتوية على ٩ مل ماء مقطر ومعقم ليصبح التركيز ١ : ١٠٠,٠٠٠ انقل بنفس الماصة ١ مل من هذا التركيز إلى طبق بترى معقم ونظيف .

٥ ـ أسل بيئة الآجار المغذى فى أربعة أنابيب (كل أنبوبة ٩ مل) وأفرغ محتويات أنبوبة واحدة بكل طبق ثم حرك الطبق إلى الأمام والخلف حتى يتم خلط البيئة بالصبغة . لاحظ أن تركيز الصبغة فى كل طبق سوف يصبح $\frac{1}{10}$ التركيز المضاف .

obeikandi.com

٦ — صب بيئة آجار مغذى فى طبق خالى من الصبغة .

٧ — بعد تصلب البيئة فى كل الأطباق ، اقلبها ، وبواسطة قلم شمع قسم الطبق إلى قسمين واكتب على كل قسم البكتيريا المستعملة فى تلقيحه .

٨ — لقح أحد قسمى الطبق بمزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من البكتيريا *E. coli* ،والقسم الآخر بمزرعة حديثة من البكتيريا *Bac . subtilis* كرر عمليات التلقيح هذه بكل الأطباق المستعملة .

٩ — ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

١٠ — دون النتائج بجدول واضح واضعا علامة (+) أمام كل تركيز لتشير إلى وجود نمو ، وعلامة (—) إلى غيابه . استنتج مايمكن أن تتيحه هذه النتائج .

ثالثا — العوامل الحيوية

توجد البكتيريات عادة فى بيئاتها الطبيعية مختلطة مع غيرها من الكائنات الحية الدقيقة ، ولا شك أن لهذه المعيشة المختلطة تأثيراً واضحاً على نمو وتأقلم البكتيريات فى هذه البيئات . وتوجد علاقات مختلفة بين الكائنات الحية الدقيقة وبعضها فى المعيشة المختلطة ، فقد تنشأ فيها علاقات تضادية Antagonismأو Antibiosis ، أومعيشةتكافلية(تبادلمنفعة) Symbiosis، أو معيشة منفعة من طرف واحد حيث أن الطرف الآخر لاينتفع أو يضار من هذه المعيشة والتى يطلق عليها التعايش الايجابى من جانب واحد Commensalism ،أوأنتلازمالكائنات مع بعضها يمكنه إحداث تغييرات فى البيئة لايمكن لاحداها أن تحدثها بمفردها وتعرف هذه الظاهرة بالتعايش الإيجابىالمشترك Synergism .

التضاد : Antibiosis or antagonism

للكائن الدقيق طرقاً مختلفة للمحافظة على بقائه . فهو إما أن يخرج مواد أيضية تغير من ظروف البيئة مثل تلك التى تزيد من حموضته ، أو تغير من الضغط الأسموزى أو التوتر السطحى للبيئة جاعلة إياها غير مناسبة لنمو الكائنات الأقل تحملا لهذه الظروف غير الطبيعية . وقد يمكن للكائن الحى أن يفرز مادة سامة يمكنها أن تتدخل بطريقة ما فى طرق التحول الأيضى للكائنات الأخرى بدرجة قد تمنع من نموها أو تؤدى بها إلى الموت . والطريقة الأخيرة من التضاد هى التى يطلق عليها اسم التضاد الحيوى Antibiosis . إذن يمكن تعريف ظاهرة التضاد الحيوى بأنها معيشة كائنين معا يعمل أحدهما على إحداث ضرر واضح بالكائن الآخر نتيجة لافرازه لمادة كيماوية . والمواد الكيماوية السامة التى تفرز تعرف باسم المضادات الحيوية Antibiotics

أولا — التضاد الطبيعى :

هو الذى يتم فى وجود نمو نشط للكائن المضاد ، ولدراسة هذا النوع من التضاد يتبع جملة طرق نذكر منها الطريقتين التاليتين :

الطريقة الأولى :

خطوات العمل :

١ — أسل بيئة آجار مغذى فى أنابيب ثم أتركها لتبرد لدرجة ٤٥°م .

٢ — لقح أنبوبتين منها بإضافة ١,٠ مل من مزرعة *Sarcina sp.* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة .

٣ — لقح الأنبوبتين الأخرتين بإضافة ١,٠ مل من مزرعة *E. coli* نامية فى بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة .

٤ – صب كل من الأنابيب الأربعة بعد التلقيح فى طبق بترى معقم وأترك البيئة الملقحة لتتصلب وأكتب اسم البكتيريا الملقحة على كل طبق .

٥ – خطط سطح الآجار بطبق واحد من الطبقين الملقحين بواحد من البكتيريتين المذكورتين بلقاح من مزرعة البكتيريا *B. subtilis* نامية على بيئة المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة .

٦ – أترك الطبقين الآخرين دون أعادة تلقيحها بالبكتيريا *B. subtilis*.

٧ – ضع الأطباق مقلوبة بالحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحصها باحثاً عن مناطق خالية من النمو البكتيرى حول خطوط نمو البكتيريا *B. subtilis* ودون نتائجك فى جدول .

الطريقة الثانية :

خطوات العمل :

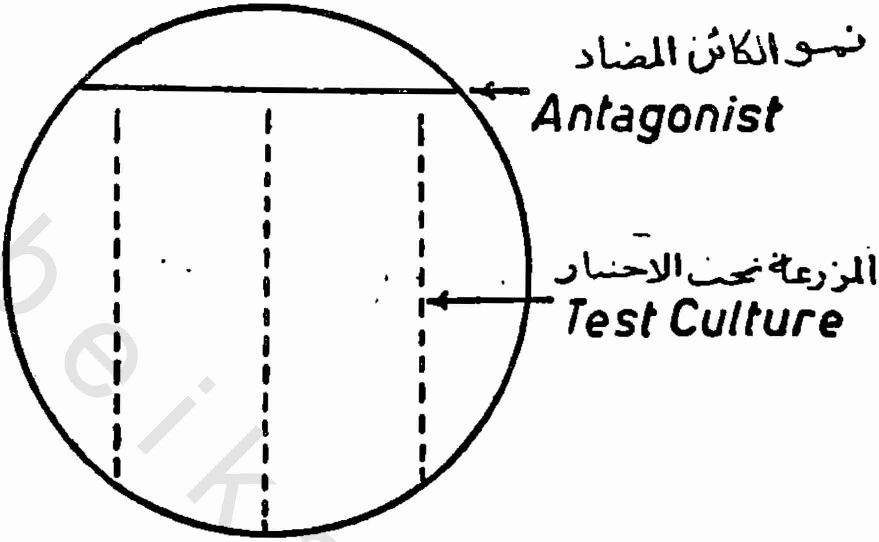
١ – صب بيئة دكستروز آجار البطاطس ، (أنظر ملحق البيئات) ، أو بيئة الآجار المغذى فى ٤ أطباق وأتركها لتتصلب .

٢ – أغمس أبرة تلقيح ذات العقدة بعد تعقيمها فى مزرعة حديثة من البكتيريا *Bacillus subtilis* . ثم خطط سطح الآجار بطبقين وذلك بعمل خطا مستعرضاً بكل طبق يبعد حوالى بوصة عن حافة الطبق (شكل ٣٩)

٣ – كرر ماسبق ولكن باستعمال معلق من جراثيم الفطر *Penicillium patulum* يخطط به سطح الآجار قرب حافة طبقين آخرين .

٤ – ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٥ – بعد أنتهاء فترة التحضين خطط سطح الآجار بشكل خطوط متعامدة



(شكل ٣٩) : احدى طرق دراسة التضاد الطبيعى .

على النمو البكتيرى أو الفطرى الناتج بعد التحضين وذلك بابرة تلقيح سبق غمسها فى مزرعة من النوع البكتيرى تحت الإختبار Test culture ويستعمل لذلك مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من *E. coli* وأخرى من *Pseudomonas solanacearum* (مزرعة بكل طبق) .

٦ — ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) مرة أخرى لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحصها ملاحظاً وجود مناطق خالية من النمو على طول خطوط تلقيح الكائن المختبر ، مستعيناً بشكل ٤٠ .

ثانيا — دراسة تأثير التحضيرات التجارية من المضادات الحيوية :

يوجد بالأسواق عدد كبير من المضادات الحيوية Antibiotics يمكن التعرف على تأثيرها فى منع نمو الكائنات البكتيرية دون الحاجة إلى إستعمال الكائن المضاد الذى يفرز هذه المضادات الحيوية . ولمثل هذه الدراسات عدة طرق نذكر منها الطريقة التالية :

obeikandl.com

طريقة أقراص ورق الترشيح :

(شكل ٤٠) : التضاد الطبيعى الذى يحدثه الفطر *Penicillium patulum* لنمو البكتيريا *Pseudomonas solonacearum* (لاحظ القوة التضادية للفطر من درجة اتساع المنطقة الخالية من النمو البكتيرى)

١ — حضر محاليل ذات تركيز ٢٠٠ ميكروجرام / ١ مل من المضادات الحيوية الآتية :

بنسلين Penicillin ، ستربتومايسين Streptomycin ، أو كسى تتراسيكلين Oxytetracycline

٢ — جهز أقراص من ورق ترشيح ماص بقطر ٧ مم ثم ضعها فى طبق بترى نظيف ثم عقمها فى الأتوكلاف .

٣ — أسل ثلاث أنابيب آجار عميق (١٥ مل بيئة آجار مغذى) ثم أتركها لتبرد (٤٥°م) .

٤ — لقح أحد الأنابيب بإضافة ١, مل من مزرعة حديثة من البكتيريا *E. coli* والأنبوبةالثانية بكمية مساوية من مزرعة حديثة من البكتيريا *Bacillus subtilis* والأنبوبة الثالثة بمزرعة من البكتيريا *Staphylococcus aureus*

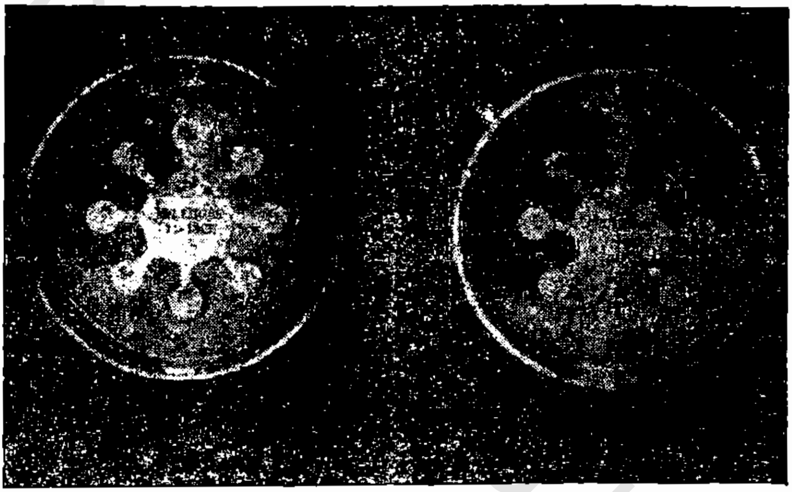
٥ — صب الأنابيب الثلاث بعد التلقيح فى ثلاثة أطباق بترى معقمة . وأتركها لتتصلب وأكتب اسم البكتيريا الملقحة بكل طبق .

٦ — إقلب الطبق وقسم قاعة بواسطة قلم شمع إلى ٣ أقسام متساوية وأكتب على كل قسم إسم أحد المضادات الحيوية بالقلم الشمع .

٧ – أضف ٠٫٠٥ مل من المضاد الحيوى بواسطة ماصة دقيقة معقمة إلى أحد أقراص ورق الترشيح ثم ضعه بواسطة ملقط معقم فى وسط القسم ، المخصص له مع الضغط البسيط على القرص حتى يلتصق بسطح الآجار . كرر ذلك باستعمال قرص لكل مضاد حيوى . (يلاحظ أن كمية المضاد الحيوى تكون فى هده الحالة ١٠ ميكروجرام لكل قرص من كل مضاد حيوى) .

٨ – حضن الأطباق فى حضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة ثم أفحصها للتأكد من وجود منطقة خالية من النمو البكتيرى حول القرص. قدر قطر المنطقة الخالية من النمو التى تتناسب كميا مع حساسية البكتيريا المعينة لمضاد حيوى معين . سجل النتائج فى جدول .

ملحوظة : يوجد بالأسواق أقراص مجهزة من ورق ترشيح تحمل كميات معلومة من المضاد الحيوى . وقد يكون كل قرص منفرداً Unidisk أو قد تكون عبارة عن قرص مكون من عدد من الأقراص الصغيرة متصلة ببعضها مركزيا (شكل ٤١) يحتوى كل قرص منها على مضاد حيوى مختلف بتركيز معين . وتعرف مجموعة الأقراص بالقرص المتعدد Multidisk ويلاحظ أن أستعمال هذه الأقراص يسهل كثيراً من إجراء الإختبار



(شكل ٤١) : تأثير المضادات الحيوية على نمو سلالتين من البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* باستعمال طريقة القرص المتعدد Multidisk method (لاحظ أن كل قرص صغير يحتوى على مضاد حيوى مختلف عن الآخر)

الانزيمات البكتيرية

يعتمد النشاط الكيماوى الحيوى للبكتيريات على عديد من الإنزيمات التى تعمل كعوامل مساعدة فى كثير من التفاعلات الابضية المختلفة . والنشاط الأنزيمى للكائن يتحدد، أولا بتركيبه الوراثى ، وثانياً بالعوامل البيئية . ويمتلك الكائن البكتيرى مجموعة من الإنزيمات الأصلية Constitutive enzymes . تتكون بالخلايا بصفة مستمرة . وأخرى تطبعية Adaptive enzymes ، تتكون فقط تحت ظروف معينة وخاصة عند توافر مادة تفاعلها . وتختلف درجة توزيع الإنزيمات الأصلية المختلفة بين البكتيريات ، فبينما يكون الكائن البكتيرى غنى بأنزيمات معينة ، نجد أن نوعا آخر لا يمتلك الكثير منها ، وبينما نجد أن أحد البكتيريات يمتلك سلسلة كاملة من الانزيمات الخاصة بتخليق مادة أيضية معـــينة ، نجد أن نوعاً آخر يمتلك بعض أفراد هده السلسلة ، أو قـــد لايمتلك أى منها على الإطلاق ، الأمر الذى يؤدى إلى الاختلافات فى نوع المواد الكيماوية الناتجة عن النشاط الايضى لهذه الكائنات . وقد أسفرت ، الدراسات الخاصة بالنشاط الانزيمى للبكتيريات المختلفة عن تفهم كثير مـــن الحقائق الكيموحيوية والوراثية ، وكذلك عن إمكان إستغلال الكائنات الحية الدقيقة وخاصة البكتيريا فى التوسع فى إنتاج بعض المواد الكيموحيوية الهامة. من ذلك نرى مدى إهتمام المشتغلون بالبكتيريولوجيا بدراسة النشاط الأنزيمى البكتيرى ، كما لايخفى مالهذه الدراسات من أهمية فى أغراض التصنيف والتقسيم وذلك لما للصفات البيوكيماوية من أهمية فى هذا الصدد .

أنزيمات التحلل المائى

تقوم البكتيريا بافراز نوعاً من الانزيمات يساعد على تحلل كثير من المواد

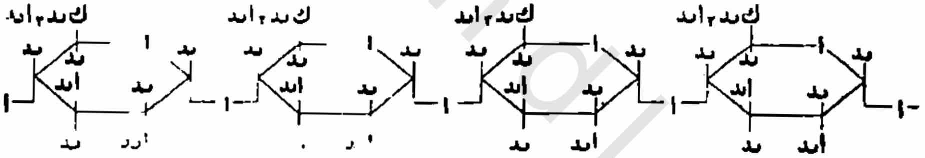
obeikandi.com

المعقدة مثل النشا ، والسليولوز ، والجيلاتين ، والكازين وغيرها من المواد ذات الجزيئات الكبيرة الحجم ، تحللا مائياً ، وذلك بغرض تحويلها إلى مواد ذات جزيئات أبسط تركيباً يسهل على الخلايا إمتصاصها .

(أ) تحلل النشا Hydrolysis of Starch

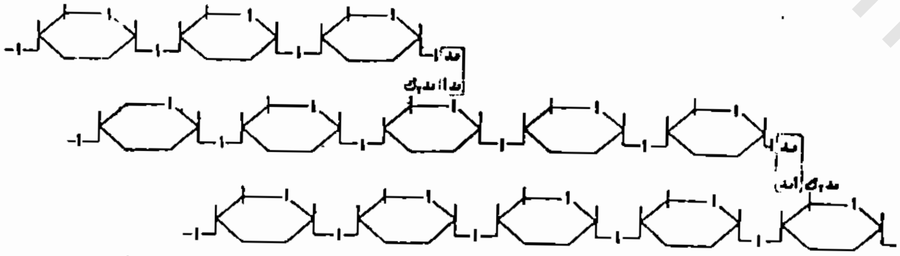
النشا عبارة عن مركب كربوأيدراتى يتكون من نوعين من عديدات التسكر Polysaccharides توجد بداخل تركيب يعرف بالحبيبة النشوية والنوعين من عديدات التسكر هما :

١ ــ الأميلوز Amylose وهو سلسلة مستقيمة تحتوى على حوالى ٢٠٠ــ٣٠٠ وحدة من الفا ــ د ــ جلوكوز ∝ -D- glucose ترتبط بالرابطة الفا الجلوكوسيدية (١ ، ٤) .



وحدات الجلوكوز المتصلة بالرابطة الفا (١ ، ٤) الجلوكوسيدية فى الاميلوز .

٢ ــ الأميلوبكتين Amylopectin وهو تركيب متفرع وزنه الجزيئى أكبر من الأميلوز وعلاوة على وجود الرابطة (١ ، ٤) الجلوكوسيدية فانه توجد أيضاً الرابطة الفا الجلوكوسيدية (١ ، ٦) عند أماكن التفرع .



رسم توضيحى للاميلوبكتيس كما اقترحه Haworth and Hirst يوضح طريقة التفرع بواسطة الروابط الفا (١ ، ٦) الجلوكوسيدية .

ويمكن لبعض البكتيريات أن تفرز إنزيمات خارجية تحلل كل من عديدات التسكر بجزيء النشا وتعرف باسم الأميلاز Amylases وهذه الإنزيمات تساعد فى عملية تحليل جزيئات النشا تحليلا مائياً إلى السكر الثنائى المالتوز Maltosc وهذه الإنزيمات هى عبارة عن :

١ – ألفا أميليز ∝ - amylase (Endo-amylase=) تحلل الروابط ١ ، ٤ الجلوكوسيدية الداخلية فتكسر الجزيء إلى وحدات كبيرة الحجم وفعلها يقف فى حالة الأميلوبكتين عند أمكنة التفرع .

٢ – بيتا أميليز *B* - amylase (Exo- amyase =) تحلل الرابطة ١، ٤ الجلوكوسيدية من الخارج وتزيل وحدات متتالية من المالتوز من الطرف غير المختزل من السلسلة .

وعلاوة على إنزيمات الأميلاز Amylases السابقة فانه يوجد الإنزيم أميلو ١ – ٦ جلوكوسيديز Amylo 1 - 6 glucosidase تحلل الرابطة ١ ، ٦ الجلوكوسيدية فى الأميلوبكتين .

وسكر المالتوز الثنائى الناتج من التحللات السابقة يمكن أن يحول إلى وحدات من السكر جلوكوز الأحادى بواسطة أنزيم المالتيز Maltase : وسكر الجلوكوز الناتج يمكن أن يهاجم فيما بعد بواسطة أنزيمات التنفس (فى داخل الخلايا) .

خطوات العمل :

١ – أسل بيئة آجار مغذى معقمة ومحتوية على نشا قابل للذوبان بنسبة ٢,٠٪ ثم صبها فى ثلاثة أطباق بترى معقمة وأتركها لتتصلب .

٢ – لقح عن طريق التخطيط البسيط سطح الآجار بأحد الأطباق بمزرعة من البكتيريا *Escherichia coli* ، وخطط سطح الآجار بالطبق الثانى

بمزرعة من البكتيريا *Bacillus subtilis* . أترك الطبق الثالث بدون تلقيح .

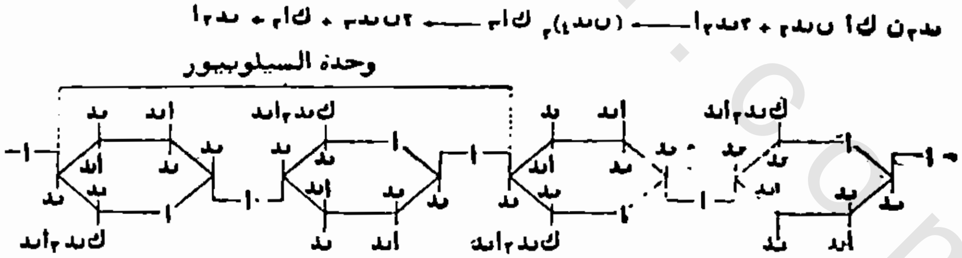
٣ ـ ضع المزارع بالحضان ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة .

٤ ـ أغمر سطح الآجار بالأطباق بكمية كافية من محلول اليود ،(محاول ليوجول Lugol's iodine solution)

٥ ـ إفحص الأطباق ولاحظ المناطق عديمة اللون حول مستعمرات البكتيريا المحللة للنشا على طول خط التلقيح ، فى حين أن وجود اللون الأزرق حول المستعمرات يدل على عدم تحلل النشا . دون النتائج فى جدول .

(ب) تحلل السيليولوز Hydrolysis of cellulose

السيليولوز عبارة عن مادة كربوإيدراتية معقدة من عديدات التسكر تتكون من سلاسل طويلة من بيتا ـ د ـ جلوكوز *B*-D glucose ترتبط بالرابطة بيتا (١ ، ٤) الجلوكوسيدية وله وزن جزيئى مرتفع قد يصل إلى ٣٠٠,٠٠٠ أو أكثر .



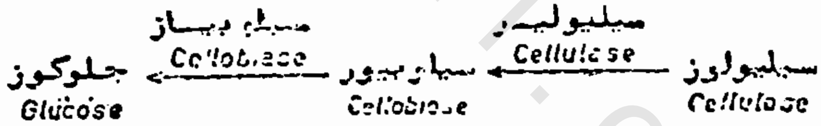
وفى الجزء من الجدر الخلوية النباتية التى تتكون من السيليولوز فان بعض المناطق تكون جزيئات السلسلة متوازية تماماً بحيث تكتسب الكثير من خواص البلاورات Crystalline cellulose وتكون أقل تنسيقاً فى مناطق أخرى (أى تكون فيها جزيئات السيليولوز غير متوازية) مكونة مايعرف بالسيليولوز اللابللورى Amorphous cellulose

وقد يشمل الجزىء السيليولوزى منطقة متبلرة وأخرى غير متبلرة .

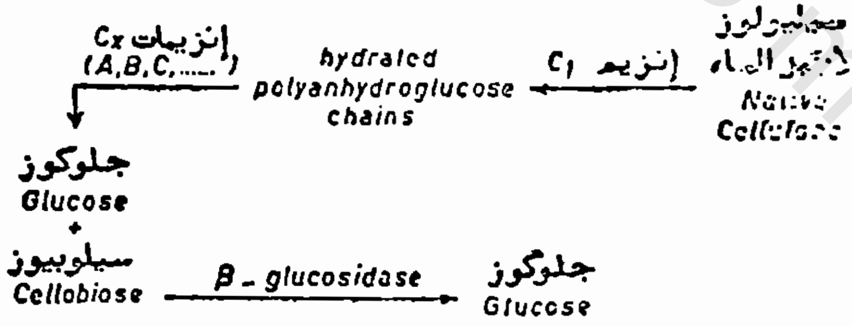
يمكن للبكتيريا أن تحلل السيليولوز إنزيمياً تحت ظروف هوائية أو غير هوائية إلى واحدات الجلوكوز . ولهذا النشاط أهمية كبرى فى تحلل البقايا النباتية بالتربة حيث تعمل الكائنات الحية الدقيقة على عدم تكدسها بالأرض ، هذا والبكتيريات المحللة للسيليولوز قد تسبب مشاكل ملحوظة فى الصناعات التى تدخل فيها المواد السيليولوزية .

وعلاوة على ذلك فان بعض البكتيريات وبعض الكائنات الحية الدقيقة الأخرى والتى تعيش بكرش الحيوانات المجترة تعمل على تحليل وهضم . السيليولوز الذى تتغذى عليه هـذه الحيوانات ويفسر التحليـل الإنزيمى للسيليولوز بنظريتين إحداهما تعرف بنظرية الأنزيم الواحد والثانية تعرف ، بنظرية الإنزيمات المتعددة ، والأخيرة هى الأقرب إلى الصحة .

النظرية الأولى :



النظرية الثانية :



obeikandl.com

خطوات العمل :

١ ـ التحلل الهوائي :

١ ـ حضر ثلاث أنابيب محتوية على ٥ مل من بيئة ديبوس Dubos medium.

٢ ـ أضف إليها ٠,١ جم سماد عضوى بلدى لكل أنبوبة ثم أغمر بها شريط من ورق ترشيح نظيف بعمق البيئة على أن يبرز منها مايقرب من ½ ٥ سم

٣ ـ عقم أنبوبة واحدة من الثلاث أنابيب بالأتوكلاف ، وأترك أثنين بدون تعقيم .

٤ ـ أحفظ الأنابيب الثلاث بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة تتراوح بين أسبوع إلى أسبوعين .

٥ ـ لاحظ حدوث النمو ودرجة تآكل ورقة الترشيح عند سطح البيئة .

٦ ـ حضر غشاء من كل أنبوبة وأصبغه بصبغه جرام وآخر بالنيجروسين للتعرف على شكل الكائنات المحللة للسيليولوز هوائياً .

٢ ـ التحلل غير الهوائي :

١ ـ حضر ثلاث أنابيب محتوية على ٥ مل من بيئة أوملیانسکی Omliansky.

٢ ـ أضف إلى كل أنبوبة ½ جم تربة أو ٠,١ جم سماد عضوى بلدى ثم أغمر بها شريط من ورق الترشيح النظيف بعمق البيئة.

٣ ـ غطى سطح البيئة فى كل أنبوبة بمزيج فاسبار Vaspar mixture . بعد إسالته وذلك لجعل الظروف غير هوائية (يمكن الاستعاضة عن مزيج فاسبار بوضع طبقة كافية (٢ مل) من زيت البرافين) .

obeikandi.com

٤ — عقم أنبوبة من الثلاث أنابيب بالأتوكلاف وأترك أثنين بدون تعقيم .

٥ — إحفظ الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة تتراوح بين أسبوع وأسبوعين .

٦ — لاحظ حدوث نمو وتحلل ورقة الترشيح تحت مزيج فاسبار فى الأنابيب غير المعقمة .

(ج) اسالة وتحلل الجيلاتين Liquefaction & hydrolysis of Gelatin

الجيلاتين عبارة عن مادة بروتينية يمكن لبعض البكتيريات أن تحلله أنزيميا وذلك لقدرتها على إفراز أنزيم الجيلاتينار Gelatinase فى بيئاتها . ويلاحظ نشاط هذا الإنزيم من الإسالة غير العكسية لبيئة الجيلاتين المتصلبة . وعادة تتوقف البكتيريات عن أفراز هذه الإنزيمات فى البيئات المحتوية على مواد كربوايدراتية ، وتعرف هذه الظاهرة بفعل الكربوايدرات الموفر للبروتينات Protein sparing action of carbohydrate . من ذلك يتضح أهمية إستعمال بيئات خالية من الكربوايدرات لاختبار إسالة الجيلاتين . واختبار إسالة الجيلاتين من الاختبارات الهامة فى أغراض التقسيم والتصنيف ويجب أن نعلم أن قدرة البكتيريات على إسالة الجيلاتين لاتعنى ، قدرتها على تحليل البروتينات المعقدة الأخرى .

خطوات العمل :

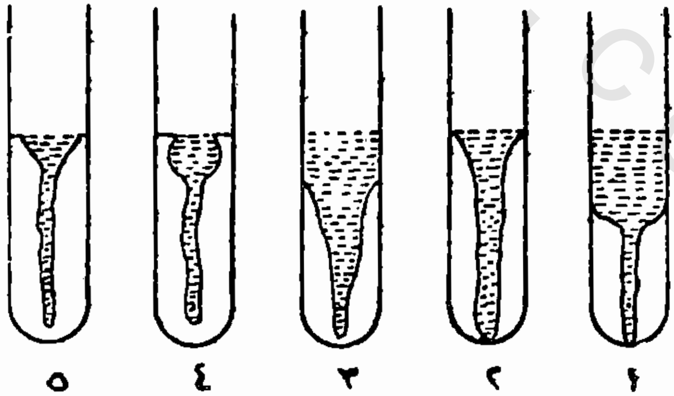
١ — لقح أنبوبة جيلاتين مغذى عميق (مرق مغذى + ١٥ ٪ جيلاتين) عن طريق الوخز بمزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من البكتيريا *E. coli* ، وأنبوبة أخرى بمزرعة حديثة (٤٨ ساعة) من البكتيريا *Bac. subtilis* أوخز أنبوبة ثالثة بواسطة إبرة معقمة للمقارنة .

٢ – صب بيئة آجار مغذى مضاف إليه جيلاتين بنسبة ١٪ فى طبقى بترى ،وأتركها لتتصلب ، ثم لقح سطح الآجار بطريق التخطيط البسيط بأحد الأطباق بالبكتريا *E.coli* والطبق الآخر بالبكتريا *Bac. subtilis*.

٣ – ضع الأنابيب والأطباق بالحضان على درجة ٢٠°م لمدة ٩٦ ساعة أو أكثر .

٤ – أخرج الأنابيب من الحضان ، إفحصها مبيناً درجة الإسالة وطبيعتها بالاستعانة بالحالات الموضحة (بشكل ٤٢) .

٥ – أغمر سطح آجار الجيلاتين بالأطباق بعد فترة التحضين (٩٦ ساعة) بمحلول ٥٪ من سلفات الأمونيوم أو محلول (١٥ ٪) كلوريد الزئبق المحمض أو بأحد الأحماض المخففة وأتركه لبضعة دقائق ثم تخلص من المحلول الزائد. فى حالة تحلل الجيلاتين تظهر طبقة رائقة حول خطوط النمو البكتيرى فى حين يتكون راسب أبيض هوعبارة عن الجيلاتين المترسب بعيداً عن النمو فى حالة عدم قدرة البكتيريا على تحليل الجيلاتين . دون النتائج فى جدول .



(شكل ٤٢) : الحالات المختلفة لإسالة الجيلاتين العميق .

١ – طباق Stratiform ٢ – كيسى Saccate

٣ – قمعى Infundibule ٤ – شكل اللفت Napiform

٥ – كأسى الشكل Crateriform

(د) تحلل الكازين Hydrolysis of Casein

الكازين هو عبارة عن بروتينات مفسفرة Phosphoprotein وهو المكون النيتروجيني الأساسي فى اللبن . يمكن لكثير من الكائنات الدقيقة أن تفرز إنزيمات خارجية تحلل هذا النوع من البروتين محولة إياه إلى خليط من المواد الذائبة ويعرف ذلك بعملية البتنة Peptonization

خطوات العمل :

١ - أسل ثلاث أنابيب من بيئة آجار مغذى ثم أتركها لتبرد إلى درجة ٤٥°م

٢ - ضع ١,٠ مل من لبن فرز معقم فى كل من ثلاثة أطباق بترى معقمة .

٣ - صب بكل طبق أنبوبة من الآجار المسال ثم حرك الأطباق لتوزيع اللبن بالبيئة توزيعاً منتظماً . ثم أترك الآجار ليتصلب بالأطباق.

٤ - لقح سطح الآجار بطريقة التخطيط البسيط بأحد الأطباق بمزرعة حديثة سائلة من *E.coli* ، وفى الطبق الآخر بمزرعة حديثة من البكتيريا *Bac subtilis* والطبق الثالث بمزرعة من البكتيريا *Streptococcus laetis* .

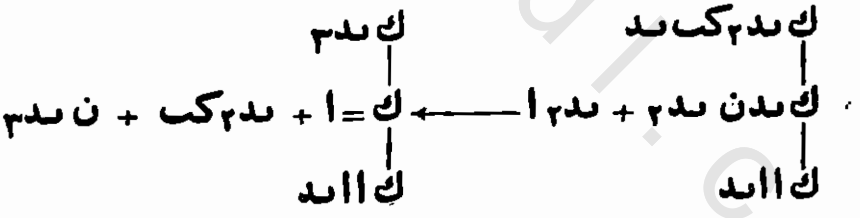
٥ - ضع الاطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة ثم أفحصها باحثاً عن مناطق رائقة حول النمو البكتيرى لتدل على تحلل الكازين

(ﻫ) تحلل الاحماض الامينية

من المعروف أن الناتج النهائى لتحلل البروتينات هو الأحماض الأمينية . بعض هذه الاحماض تهاجم بواسطة بعض البكتيريات لتحوله إلى جزيئات أقل حجما ونتيجة لهذا التحلل تتكون بعض المواد ذات طابع خاص يمكن التعرف عليها من خواصها المعينة .

١ — انتاج كبريتور الإيدروجين

تحتوى بعض الاحماض الأمينية مثل السيستين Cystine والسستايين Cysteine على ذرات كبريت فى جزيئاتها وعند تحللها ينطلق غاز كبريتور الأيدروجين ذو الرائحة الكريهة المميزة والذى يمكن الكشف عنه بطرق كيماوية بسيطة.



سيستايين　　　　بيروفيك

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من كل من البكتيريات الآتية : *E. coli* و *Proteus vulgaris* .

٢ — حضر أنابيب عميقة من آجار كليجلر Kligler (المحتوية على كبريتات الحديدوز) .

Obeikandl.com

٣ — لقح بطريق الوخز أنبوبة من البيئة بكل من المزارع البكتيريـــة ، وأحتفظ بأنبوبة رابعة بدون تلقيح للمقارنة .

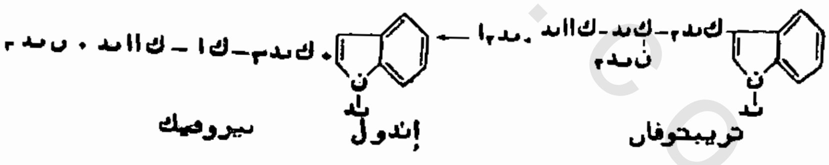
٤ — ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢ — ٧ أيام .

٥ — أفحص الأنابيب لاحظ تكون لون أسود هوعبارة عن كبريتور الحديديك على طول خط النمو نتيجة لانتاج يد٢ كب وتفاعله مع أيونات الحديد بالبيئة .

٦ — لاحظ لون البيئة . تغير لون البيئة من اللون الأحمر إلى الأصفر يدل على إنخفاض قيمة pH البيئة وتكون أحماض .

٢ — انتاج الأندول

بعض البكتيريات تحلل الحمض الأميني تريبتوفان Tryptophane وتفصل منه الجزء الحلقي الذى هوعبارة عن الإندول Indole طبقاً للمعادلة التالية :



وعكن الإستدلال على هذا التحلل بالكشف عن مادة الإندول بالبيئة ومن المعروف أن البكتيريات تختلف فى قدرتها على مهاجمة حمض التريبتوفان الأميني وإنتاج الأندول لذلك فان هذا الاختبار يعتبر من الاختبارات الهامة فى أغراض التصنيف البكتيرى . ويلاحظ أن بعض الكائنات تكون لها القدرة على تحليل الاندول الذى تكونه بالطريقة المذكورة وبذلك قد تعطى نتيجـــة سلبية تخالف الحقيقة .

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من كل من البكتيريات الآتية :
Bacillus subtilis, E coli

٢ — حضر ثلاثة أنابيب من بيئة مرق التريبتون المعقم الغنية بالحمض الأميني تريبتوفان .

٣ — لقح أنبوبة من البيئة بكل من المزارع البكتيرية المذكورة . أترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة .

٤ — ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥ — أكشف عن وجود الاندول بنقل كمية ٤ مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إليها كمية ٠,٣ — ٠,٤ مل من كاشف كوفاكKovac (راجع ملحق المحاليل والبيئات) . رج الأنبوبة ثم أتركها لتطفو كمية كاشف كوفاك فوق سطح المحلول . تلون الطبقة السطحية من المزرعة باللون الأحمر الغامق يدل على وجود الاندول .

تحلل الأرجنين Arginine hydrolysis

١ — حضر بيئة مرق الأرجنين . وهي تتكون من ٥ جرام تريبتون و٥ جرام مستخلص خميرة و٢جرام فوسفات بوتاسيوم أحادية الأيدروجين و٣ جرام ل — أرجنين (monahydrochloride) و٠,٥ جرام دكستروز وماء ١٠٠٠مل ويضبط الpH إلى٧وتعبأفي أنابيب وتعقم على ١١٥°م لمدة ١٠ دقائق .

٢ — لقح أنابيب بيئة مرق الأرجنين وتحضن المزارع لمدة ٢٤ —٤٨ساعة .

٣ ـ أضف قطرات من محلول نسلر . ظهور لون بنى يدل على تحلل الأرجنين .

إزالة الأمين من الفينايل ألانين Phenylalanine deaminase

١ ـ ضع فى أنبوبة إختبار صغيرة الآتى : ٢ نقطة من محلول ٠,٠٣ جزيئى فينيل ألانين و٢ نقطة ٠,٠٢٥ جزيئى محلول منظم فوسفاتى ((pH 6.8) و٢ نقطة من معلق كثيف للخلايا المراد إختباره على أن يكون عمر المزرعة المحضر منه معلق الخلايا ٤٨ ساعة .

٢ ـ حضن هذا المخلوط لمدة ٢ ساعة عند ٢٨°م ثم أضف ٢ نقطة من محلول ٠,٥ جزيئى كلوريد حديديك .

٣ ـ ظهور لون أخضر دليل على إنتاج حمض Phenylpuruvic من الفينايل ألانين نتيجة لازالة مجموعة الأمين بواسطة إنزيم Phenylalanine deaminase

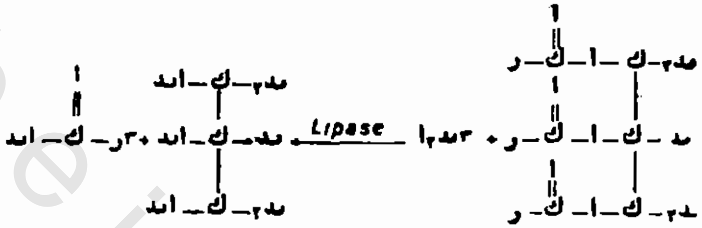
إزالة مجموعة الكربوكسيل من الأحماض الأمينية Amino acid decarboxylase

١ ـ ضع فى أنبوبة إختبار صغيرة الآتى : ٢ نقطة من محلول ١٪ من الحمض الأمينى ليوسين أو ميثيونين و٢ نقطة من محلول منظم فوسفاتى ٠,١٢٥ جزيئى (pH5) و٢ نقطة من محلول بروموكريزول أرجوانى و٢ نقطة من معلق كثيف للخلايا البكتيرية المراد إختبارها على أن يكون عمر المزرعة المحضر منه معلق الخلايا ٤٨ ساعة .

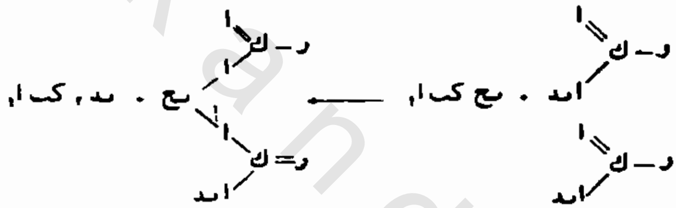
٢ ـ حضن هذا المخلوط لمدة ٢ ـ ٦ ساعة من ٢٨°م . إذا حدث تغير فى لون الدليل يدل ذلك على نشاط أنزيم ال decorboxylase.

(ز) تحلل الدهن Hydrolysis of fats

يمكن لبعض البكتيريات أن تحلل الجلسريدات إلى جليسرول وأحماض



جلسريد ثلاثي جلسرين



مركب أخضر اللون

دهنية . وهذا التفاعل يعتبر تفاعلا مبدئيا لحدوث ظاهرة تزنخ الدهون والزيوت ويمكن الكشف عن الأحماض الدهنية الناتجة عن التحلل باضافة أيونات النحاس التي تتحد بها مخليباً مكونة مركب معقد ذو لون أخضر مميز . ورغماً عن أن هذا التفاعل يمكن إتباعه كأحد الاختبارات اللازمة لأغراض التصنيف والتقسيم ، إلا أنه قليلا مايستعمل فى هذا الغرض .

خطوات العمل :

١ ــ أسل ٥٠ مل من بيئة الآجار المغذى المعقمة فى دورق مخروطى ثم أضف إليها ١ مل من زيت بذرة القطن المعقم .

٢ ــ رج البيئة لتمزجها بالزيت جيداً .

obeikandl.com

٣ - صب البيئة فى ٣ أطباق بترى معقمة ، ثم أترك البيئة لتتصلب بالأطباق .

٤ - لقح سطح البيئة عن طريق التخطيط البسيط كما يلى :

الطبق الأول بمزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من البكتيريا *E. coli* .

الطبق الثانى بمزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من البكتيريا *Bac. subtilis* .

الطبق الثالث بمزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من البكتيريا *Ps. marginata* .

٥ - ضع الأطباق مقلوبة بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٩٦ ساعة .

٦ - أغمر سطح الأطباق بكمية كافية من محلول ٢٠٪ من كبريتات النحاس وأتركه عليها لمدة ١٠ دقائق تخلص بعدها من محلول كبريتات النحاس ثم أترك الأطباق مدة ٣ - ٥ دقائق ثم افحصها .

٧ - لاحظ وجود لون أخضر على طول خط التلقيح فى حالة تحليل الزيت . (يستحسن تعريض الأطباق لضوء صناعى أثناء الفحص) .

أنتاج الأمونيا

إن تكون الأمونيا بمزارع البكتيريا يحدث عادة نتيجة لعملية إزالة مجاميع الامين Deami natio من الأحماض الامينية الموجودة بالبيئة أو المتكونة عقب تحلل البروتينات . ومن المعروف أنه قبل مهاجمة الحمض الأمينى لاستعماله كمصدر للطاقة والبناء يجب أن يفصل منه مجموعة الأمين . ومن الملاحظ أن عملية فصل مجاميع الأمين هذه تتوقف أو يقل معدلها فى وجود الكربوايدرات القابلة للتخمر بالبيئة إذ أن لها فعلا موفراً للبروتينات والأحماض الأمينية .

ويمكن أيضاً لبعض البكتيريات وخاصة تلك التى تعيش بالتربة أن تنتج

الأمونيا نتيجة لتحليلها لليوريا ولامتلاكها لإنزيم Urease الذى يحلل اليوريا طبقاً للمعادلة التالية .

يد٢كان يد٢ + ٢يد٢ا ← (نيد٤)٢ كأ٣ ← ٢نيد٣ + كأ٢ + يد٢أ

خطوات العمل :

١ — حضر مزارع حديثة النمو (عمرها ٢٤ ساعة) من كل من
Micrococcus ureae, *E. coli*, *Bacillus subtilis*

٢ — حضر أربعة أنابيب من بيئة المرق المغذى وأربعة أنابيب أخرى من بيئة مرق اليوريا المعقمة بالترشيح .

٣ — لقح أنبوبة من كل بيئة بالمزارع السابقة وأترك الانبوبة الرابعة من كل بيئة بدون تلقيح للمقارنة .

٤ — ضع الانابيب بالحضان (٣٧°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٥ — إختبر وجود الأمونيا فى كل أنبوبة باستعمال محلول نسلر Nessler reagent ، وذلك بخلط كمية من المزرعة بعد نموها لمدة ٤٨ ساعة بكمية من محلول نسلر . يلاحظ تكون لون أصفر أو أصفر غامق أو راسب بنى حسب كمية الأمونيا المتكونة .

أنزيمات الأكسدة

إن عمليات الأكسدة البيولوجية عموماً تعتمد على وجود مجموعة من الأنزيمات تعرف بالأنزيمات المزيلة للهيدروجين Dehydrogenases .

وهذه الانزيمات قادرة على تنشيط الهيدروجين بمادة التفاعل بدرجة تجعلها قابلة للتأكسد هوائياً فى وجود الاكسجين وتعرف عمليات الأكسدة هنا بالأكسدة الهوائية أو التنفس . أو أن تتم عملية الأكسدة فى ظروف غير هوائية

obeikandi.com

فى وجود بعض المواد القابلة للاختزال عضوية كانت أو غير عضوية وتعرف عمليات الأكسدة هنا بالأكسدة غير الهوائية أو التخمر .

اختزال صبغة أزرق الميثيلين

صبغة أزرق الميثيلين ذات لون أزرق فى حالتها المؤكسدة وتصبح عديمة اللون عندما تستقبل الايدروجين أو بمعنى آخر عندما تختزل وسرعة إختزال لون هذه الصبغة يبين مدى سرعة عمليات الأكسدة بالمزرعة . وإذا حدثت عملية اختزال أزرق الميثيلين فى وجود الهواء أو إذا مرر بالمزرعة تيار من الهواء فان ذلك يعمل على إعادة أكسدة الصبغة وعودتها إلى اللون الأزرق مرة ثانية. لذلك يجب إجراء هذا الإختبار بعيداً عن الهواء أو بعد وضع طبقة من زيت البارافين فوق سطح المزرعة المراد إختبار نشاطها التأكسدى عن هذا الطريق.

وإختزال لون صبغه أزرق الميثيلين يرجع إلى نشاط أنزيمات الديهيدرو جيناز فى وجود مواد التفاعل العضوية المختلفة . وقد يجرى هذا الإختبار . السريع على عينات اللبن تحت ظروف معينة؛ للتعرف على مدى تلوث اللبن بالكائنات الحية الدقيقة ، فكلما قل الوقت اللازم لاختزال الصبغة دل ذلك على شدة تلوث العينة المختبرة . وفيما يلى كيفية تقدير نشاط هذه الانزيمات .

خطوات العمل :

١ - حضر مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من البكتيريا *E. coli* نامية على بيئة آجار مغذى .

٢ - علق النمو الناتج فى ١٠ مل من الماء المقطر المعقم .

٣ - حضر أنبوبتين نظيفتين وضع بكل مايلى :

obeikandl.com

١ مل محلول ١٪ سكر جلوكوز + ١ مل محلول ١٠–٤ من أزرق الميثيلين + ١ مل محلول منظم فوسفاتى (pH = ٧) .

٤ — أضف إلى أحد الانابيب ١ مل من معلق الخلايا و١ مل ماء مقطر ومعقم فى الأنبوبة الثانية .

٥ — ضع بسرعة ٢ مل من زيت بارافين معقم فوق المخلوط بعد رجه .

٦ — ضع الانابيب فى حمام مائى على ٣٧°م .

٧ — إحسب الوقت اللازم لاختفاء لون أزرق الميثيلين فى الأنبوبة الأولى .

أختزال فوق أكسيد الايدروجين

قد تتكون أثناء عمليات الأكسدة الهوائية مادة فوق أكسيد الإيدروجين نتيجة لتفاعل الايدروجين المنفصل من مواد التفاعل أو من المواد الوسطية فى عمليات الأكسدة مع الأكسجين الجوى . ولما كانت هذه المادة (يد٢ا٢) ذات تأثير سام للخلايا فان الخلايا البكتيرية الهوائية تتميز بانتاج انزيم خاص يعرف بانزيم الكاتاليز Catalase يعمل على إختزال فوق أكسيد الأيدروجين ويحوله إلى ماء مع أنطلاق غاز الأكسجين طبقا للمعادلة التالية :

كاتالـــــــيز

٢ يد٢ا٢ ⟵ ٢ يد٢ا + ا٢

هذا والبكتيريات غير الهوائية إجباراً تفتقر إلى هذا الأنزيم ويقال أن ذلك هو السبب فى تسممها عندما تتعرض إلى الهواء .

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة حديثة بعمر ٢٤ ساعة وأخرى قديمة بعمر أسبوعين

obeikandi.com

لكل من البكتيريات التالية : *E. coli, Streptococcus lactis* ونامية على بيئة آجار مائل .

٢ — أغمر سطح المزرعة بكل أنبوبة بكمية كافية من محلول ٣٪ من فوق أكسيد الايدروجين ولاحظ درجة تصاعد الفقاقيع نتيجة لانطلاق غاز الأكسجين وذلك دلالة على وجود إنزيم الكاتاليز .

اختزال النترات Reduction of Nitrates

كثير من البكتيريات لها القدرة على أختزال النترات Nitrate إلى نيتريت Nitrite والبعض الآخر يمكن أن يختزل النيتريت إلى أمونيا .

ن ا٣ ← ن ا٢ ← ن يد٣

والنترات والنيتريت تعتبر من المواد المساعدة فى عمليات الأكسدة غير الهوائية حيث أنها تستعمل كمستقبلات للايدروجين عندما تتحول إلى أمونيا . من ذلك نرى أن اختزال النترات أو النيتريت يتم بدرجة كبيرة تحت الظروف غير الهوائية ويمتنع فى حالة تهوية المزارع .

وتعتمد أيضا عمليات الاختزال هذه على تركيز أيون الإيدروجين بالبيئة ، ففى البيئة القلوية التأثير يختزل النترات إلى نيتريت فى حين أنها تصل إلى مرحلة الأمونيا فى حالة الحموضة المرتفعة . ويعتبر هذا الإختبار من الاختبارات التصنيفية الهامة .

خطوات العمل :

١ — جهز مزرعة حديثة النمو (٢٤ ساعة) من كل من البكتيريات الآتية .

.E. coli , Bacillus subtilis

obeikandi.com

٢ – لقح بكل من المزارع السابقة أنبوبة من بيئة مرق النترات . أترك أنبوبة بدون تلقيح للمقارنة .

٣ – ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ ساعة ثم اكشف عـــن النيتريت والأمونيا فى المزارع الناتجة . للكشف عن النيتريت أنقل ٣ مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إليها ١ مل من محلول حمض السلفانيليك Sulfanilic acid reagent ثم ½ مل من محلول ألفانفثايل أمين –nap hthylamine *

إذا ظهر بالأنبوبة لون أحمر وردى دل ذلك على وجود النيتريت .

وهناك طريقة أخرى للكشف عن النيتريت وذلك بإضافة قليل من كـل من حامض خليك ٣٣٪ ومسحوق الثيويوريا ومحلول كلوريد حديديك ١٠٪ إلى ٢ مل من المزرعة فى حالة وجود نا٢ يتكون لون أحمر طوبى من ثيوسيانات الحديديك ح (كب لكن)٣ .

وللكشف عن الأمونيا يستعمل محلول نسلر كما سبق فى التمرين السابق

٤ – دون النتائج فى جدول مناسب .

نشاط الأوكسيديز Oxidase Activity

١ – أضف إلى المزرعة النامية فى بيئة مرق الجليسرول ١ مل من محلول مائى من البارأمينوفينول (٠,٤٪) .

٢ – ظهور لون بنى خلال ١٠ دقائق يدل على أن الإختبار موجب .

تخمر الكربوهيدرات

تختلف البكتيريات أختلافاً كبيراً فى قدراتها التخميرية للمواد الكربوهيدراتية فبعضها يمكنه أكسدة السكريات البسيطة مكونا حمض وغاز والبعض الآخر يخمر نفس السكر وينتج أحماضا فقط . فى حين أن البعض الآخر يكون غير قادر كلية على تخمير هذا السكر . والمعلومات الخاصة بقدرة الكائن البكتيرى التخمرية للسكريات أو المواد الكربونية المختلفة تعتبر هامة جداً فى التعرف على البكتيريات وتصنيفها . والغرض من التمرين التالى إظهار قدرة البكتيريا على تخمر السكريات من حيث تكوين أحماض أو غازات بصفة عامة بصرف النظر عن نوع المواد الناتجة عن التخمر .

خطوات العمل :

١ — حضر مزارع حديثة النمو (٢٤ ساعة) نامية على بيئة آجار مغذى من البكتيريات الآتية *E. coli , Bacillus subtilis , Pseudomonas marginata*

٢ — حضر أنابيب درهام محتوية ٩ مل من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين غير عضوى مع دليل أزرق البروموثيمول — brom thymol blue (أنظر ملحق البيئات) أو من بيئة تخمر السكريات المكونة من مصدر نيتروجين عضوى والمضاف إليها دليل البرو موكريزول الأرجوانى Brom cresol purple ، وتعرف البيئة الأخيرة باسم قاعدة المرق القرمزى Purple broth base (قد تختلف نتائج تخمر السكريات حسب نوع البيئة المستعملة وخاصة فى حالة البكتيريات التابعة للجنس *Pseudomonas*) .

٣ — حضر محاليل بتركيز ٢٪ من السكريات الآتى بيانها مع تعقيمها ، بالترشيح أو باستعمال التعقيم البخارى المتقطع خاصة مع السكريات الثنائية .

أرابينوز — جلوكوز — لاكتوز — سكروز — مالتوز

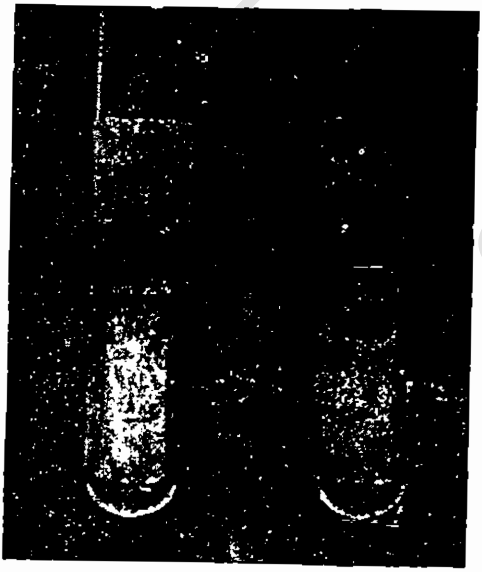
٤ — أضف إلى البيئة بكل أنبوبة ١ مل من محلول السكر المعقم والمراد إختبار تخمره ليصبح تركيز السكر بالبيئة ٠,٢ ٪ .

٥ — لقح أنبوبتين من كل سكر من المزرعة المراد إختبارها .

٦ — ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة أسبوع أو أكثر .

٧ — إفحص الأنابيب دوريا كل ٤٨ ساعة باحثا عن تغير لون البيئة إلى اللون الأصفر عند تكون أحماض وتجمع فقاقيع غازية فى أنابيب درهام ، الصغيرة الداخلية عندما تتكون غازات (شكل ٤٣)

٨ — دون نتائجك فى جدول مناسب .



(شكل ٤٣) : تخمر السكريات

ا — تكون حمض وغاز ، ب — تكون حمض فقط

obeikan.com

الكشف عن بعض المواد الهامة الناتجة عن تخمر السكريات

أختبار فوجس بروسكاور — أحمر الميثيل Methyl Red-Voges Proskauer Test

تختلف البكتيريات فى ناتج تخمرها للسكريات البسيطة فبينما بعضها تنتج أحماضاً تكون البعض الآخر كحولات والبعض الآخر موادا متعادلة . فى حالة البكتيريا *E.coli* فانه يتكون حمض البيروفيك كيدم كاكاايد كمادة وسطية لتخمر الجلوكوز ، ثم يتكون منه حمض خليك كيدم كاايد وحمض فورميك يدكاايد والأخير يتحلل إلى غاز كا٢ وغاز الإيدروجين .وتحت ظروف بيئية أخرى يختزل حمض البيروفيك ويتكون نتيجة لذلك أحماضاً أخرى .

وبذلك يكون ناتج تخمر الجلوكوز فى حالة *E. coli* عبارة عن أحماض عضوية وغازات وأحيانا بعض الكحولات أما فى حالة البكتيريا *Aerobacter aerogenes* فانه يحدث تكثف لجزيئين من حمض البيروفيك مع إزالة ٢ كا٢ ويتكون مركب متعادل هو الاسيتايل ميثيل كربينول Acetyl methyl carbinol كيدم كاك يدايدكيدم . وعلى ذلك فان إختبار فوجس بروسكاور يجرى للكشف عن مادة الاسيتايل ميثيل كربينول فاذا وجدت يكون الاختبار موجب V.P + وإذا لم توجد يكون الاختبار سالب -.V.P فى حين أن أختبار أحمر الميثيل يجرى لاختبار تكوين أحماض عضوية فعلى ذلك يكون موجب +.M.R فى حالة وجود أحماض عضوية وسالب. -.M.R فى حالة غياب هذه الإحماض. وعادة يجرى الاختبار لأغراض التعرف والتصنيف لكثير من البكتيريات خاصة للتمييز بين البكتيريات التى تسمى بكتيريا القولون .

obeikandl.com

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة حديثة (٢٤ ساعة) من كل من *E.coli, Aerobacter aerogenes*

٢ — حضر ٣ أنابيب من بيئة فوجس بروسكاور — أحمر الميثيل (راجع ملحق البيئات) .

٣ — لقح أنبوبة بكل مزرعة مع ترك الأنبوبة الثالثة بدون تلقيح للمقارنة

٤ — ضع الأنابيب بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٤٨ ساعة .

٥ — بعد إنتهاء فترة التحضين اكشف عن مادة الاسيتايل ميثيل كاربينول بنقل ١ مل من المزرعة إلى أنبوبة نظيفة ثم أضف إلى الأنبوبة $\frac{1}{2}$ مل من محلول باريت (أ) Barritt A ، $\frac{1}{2}$ مل من محلول باريت (ب) Barritt B (أنظر ملحق المحاليل) . رج محتويات الأنبوبة وأتركها معرضة للهواء لمدة ٥ — ١٥ دقيقة . لاحظ تكون لون أحمر وردى بالأنبوبة ليدل على وجود مادة الاسيتايل ميثيل كاربينول .

ملحوظة : فى التفاعلات السلبية لايحدث تلون بالأنبوبة لمدة ساعة إلا أنه قد يظهر لون وردى بعد ذلك نتيجة لتفاعل بوايد ، مع الألفانفثول .

٦ — اكشف عن تكون أحماض بالمزرعة ، وذلك بإضافة عدة نقط من دليل أحمر الميثايل إلى ماتبقى من المزرعة لاحظ تكون لون أحمر غامق (رقم pH ٤،٦ أو أقل) إذا كان الاختبار موجباً .

أختبار تكون حمض البيوتريك

بعض الأنواع البكتيرية يتميز باحداث تخمر بيوتيرى للسكريات بمعنى أن حمض البيوتريك Butyric acid (ك يد٣ ك يد٢ ك يد٢ ك ا ا يد) يكون

obeikandi.com

ضمن المواد العديدة الناتجة عن تخمر سكر الجلوكوز أو غيره من السكريات وعادة يتم تكون هذا الحمض عند سيادة الظروف غير الهوائية . وقد تلوث مثل هذه البكتيريات اللبن محدثة به تخمراً مماثلا يعرف بالتخمر البيوتيرى .

خطوات العمل :

١ ـ حضر أنابيب من بيئة اللبن الفرز المضاف إليه البروموكريزول الأرجوانى .

٢ ـ لقح أنبوبة بمزرعة حديثة من البكتيريا *Clostridium butyricum* وأنبوبة أخرى بالبكتيريا *E. coli* . أحتفظ بأنبوبة ثالثة دون تلقيح للمقارنة.

٣ ـ أضف إلى كل أنبوبة كمية قليلة من مسحوق كربونات الكالسيوم .

٤ ـ صب كمية كافية من مزيج فاسبار المنصهر فوق سطح البيئة ثم أترك الأنابيب فى وضع قائم ليتصلب مزيج فاسبار .

٥ ـ ضع الأنابيب بالحضان (٣٠°م) لمدة ٢ ـ ٤ يوم .

٦ ـ تخلص من طبقة الفاسبار وذلك بتسخين الأنبوبة قليلا مقابل المزيج المتصلب ثم أنزع الكتلة المتصلبة بواسطة إبرة التلقيح .

٧ ـ لاحظ لون ورائحة البيئة . تغير لون الدليل إلى اللون المصفر . وظهور رائحة تشبه رائحة الزبد المتزنخ تدل على وجود حمض البيوتريك .

أختبار تكوين كحول الايثايل

قد يمثل كحول الايثايل (كيد$_3$ كيد$_2$ ايد) وثانى أكسيد الكربون أهم ناتج لتخمر السكريات عن طريق بعض الكائنات الحية الدقيقة كما فى حالة الخميرة . أو قد يكون واحداً من النواتج العديدة لتخمر السكريات بواسطة

obeikandi.com

كثير من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى مثل بعض البكتيريات كبكتيريات القولون . وتستغل هذه الظاهرة فى بعض الصناعات الغذائية كانتاج المشروبات الكحولية وإنتاج الكحول .

خطوات العمل :

١ — حضر مزارع عمرها أسبوع من الكائنات الحية الآتية :
Saccharomyces cerevisiae, E. coli النامية فى بيئة مرق خلاصة المولت .

٢ — اختبر فى المزرعة لوجود كحول الايثايل بنقل ٥ مل من المزرعة (يراعى عدم رج المزرعة) إلى أنبوبة نظيفة . أضف إليها ٤ نقط من محلول ص ا يد ١٠ ٪ ثم أضف عدة نقط من محلول اليود المركز (راجع ملحق المحاليل) . لاحظ تكون راسب أصفر من اليود وفورم ك يدىم فى حالة وجود كحول الايثايل . إذا لم يتكون الراسب مباشرة يمكن تسخين المخلوط إلى درجة ٦٠°م لمدة ١ دقيقة إذا لم يتكون الراسب بعد ذلك فان ذلك دليل على غياب كحول الإيثايل من المزرعة .

التغيرات التى تحدثها الاحياء الدقيقة فى بيئة لبن عباد الشمس

تحدث الإحياء الدقيقة عدة تغيرات فى بيئة لبن عباد الشمس Litmus milk نتيجة لنموها عليه وتختلف البكتيريات فى قدرتها على إحداث هذه التغيرات لذلك استغل هذا الاختبار فى الاغراض التصنيفية .

خطوات العمل :

١ — حضر مزرعة عمرها ٢٤ ساعة من كل من البكتيريات الآتية :
Streptococcus lactis, Bacillus subtilis, E.coli

٢ — جهز ٤ أنابيب من بيئة لبن عباد الشمس .

٣ — لقح ٣ أنابيب كل بكائن من الكائنات السابقة . أترك الرابعة بدون تلقيح للمقارنة .

٤ — ضع الأنابيب فى الحضان على درجة ٣٧°م لمدة أسبوعين مع الفحص الدورى كل يومين بحثاً عن التغيرات التى تحدث للبيئة .

ويمكن تلخيص التغييرات التى يمكن حدوثها لبيئة اللبن فيما يلى :

(ا) إنتاج أحماض أوقلويات : يتغير لون دليل عباد الشمس إلى اللون الأحمر فى الوسط الحمضى واللون الأزرق الغامق فى الوسط القلوى .

(ب) التجبن : يكون التجبن حمضياً وذلك بتكوين خثرة حمضية لترسيب كازينات الكالسيوم الذروية نتيجة لتكوين الأحماض العضوية وفى هذه الحالة يتغير لون الدليل إلى اللون الأحمر مع تكون شرش واضح بينما يتكون التجبن إنزيميا وتتكون خثرة انزيمية متماسكة وملساء (بارا كازينات الكالسيوم) نتيجة لإفراز إنزيم أو إنزيمات مماثلة للرنين Rennin بواسطة البكتريا فى وجود أيونات الكالسيوم ولايتغير فى هذه الحالة لون الدليل حيث تظل البيئة متعادلة.

(حـ) تكوين غازات: عند تكوين الغازات يحدث تثقيباً للخثرة المتكونة.

(د) هضم كازين اللبن Peptonization : يطلق على هضم وتحويل كازين اللبن غير الذائب وتحويله إلى مركبات ذائبة اسم Peptonization ويلاحظ ذلك بأن يصبح اللبن رائق لهضم الكازين وملون بلون أصفر (مثل لون المشمش أو القش) .

(هـ) أختزال صبغة عباد الشمس : ويستدل عليه فى اختفاء لون الدليل نتيجة لاختزاله بحيث تصبح البيئة عديمة اللون . ويبدأ الإختزال قرب قاع الأنبوبة . وقد تشاهد حلقة حمراء باهتة اللون بين المنطقة المختزلة وغير المختزلة من البيئة .

تحلل الأسكيولين Aesculin hydrolysis

١ – حضر بيئة الأسكيولين وهى تحضر كالآتى :

أضف إلى ١٠٠ مل ماء البيتون ١ ,٠ جرام من الأسكيولين و٠,٠٥ جرام سترات الحديديك وتوضع فى أنابيب وتعقم فى الاتوكلاف على ١١٥°م لمدة ١٠ دقائق .

٢ – لقح أنابيب بيئة الأسكيولين وتحضن الأنابيب لمدة ٢٤ ساعة .

٣ – الكائن الذى يحلل الإسكيولين يؤدى إلى تلوين البيئة باللون الأسود . وتحلل الإسكيولين يتم بواسطة إنزيم β - glucosidase

إنتاج مواد مختزلة من السكروز Production of reducing substance from sucrose

١ – حضر بيئة تتكون من ١٠ جرام ببتون و٥ جرام مستخلص لحم و٤٠ جرام سكروز و١٠٠٠ مل ماء . وتعبأ فى أنابيب وتعقم فى الأوتوكلاف.

٢ – لقح الأنابيب التى تحتوى على بيئة السكروز السابق تجهيزها بالكائن البكتيرى المراد إختباره وتحضن المزارع لمدة ٤٨ – ٧٢ ساعة.

٣ – بعد التحضين أضف إلى ٢ مل من المزرعة الى ٢ مل من محلول بندكت فى أنبوبة إختبار . ضع الأنبوبة فى ماء يغلى لمدة ١٠ دقائق .

٤ – ظهور لون أصفر إلى بنى يدل على أن الإختبار موجب وتكونت مادة مختزلة من السكروز .

إنتاج ٢ – كيتوجلوكونات : Praduction of 2 - Ketogluconate

١ – حضر بيئة سائلة مكونه من تريبتون ١٥ , ٪ ومستخلص خميرة ١, ٪ وفوسفات بوتاسيوم أحادية الإيدروجين ١,٪ وجلوكانات الكالسيوم

٤ ٪ . تعبأ البيئة فى دوارق مخروطية ٥٠ مل من البيئة لكل دورق وتعقم فى الأتوكلاف .

٢ — لقح البيئة فى الدوارق بلقاح من مزرعة حديثة من البكتيريا وتحضن المزارع عند ٣٠ °م وتختبر لإنتاج ٢ — كيتو جلوكونات بعد ٥ أو ١٠ يوم بأتباع الطريقة الآتية : أضف ١٠ مل من محلول بندكت إلى ١ مل من المزرعة وتسخن فى حمام مائى (١٠٠ °م) لمدة ١٠ دقائق . ثم برد بسرعة وتترك ١٢ ساعة . إنتاج راسب برتقالى أو بنى يدل على أن الإختبار موجب .

إنتاج الليفان Levan production

١ — حضر بيئة آجار مغذى مضاف إليها ٥ ٪ سكروز .

٢ — صب بيئة آجار السكروز فى أطباق بترى معقمة . وبعد تصلب البيئة تلقح بطريقة التخطيط البسيط بلقاح مخفف من الكائن البكتيرى المراد إختباره . وتحضن الأطباق لمدة ٤٨ ساعة .

٣ — إذا ظهرت المستعمرات بلون أبيض وتكون مخاطية شديدة التحدب يكون دليلا على إنتاج الليفان .

obeikandl.com

١١

التعرف على الانواع البكتيرية

IDENTIFICATION OF BACTERIAL SPECIES

بعد عزل كائن بكتيرى ما فى مزرعة نقية فانه يمكن تحديد نوعه وذلك عن طريق مجموعة من الدراسات تشمل الصفات الظاهرية للخلايا Morphological characteristics والصفات المزرعية Cultural characteristics والاختبارات الفسيولوجية Physiological tests، علاوة على اختبار القدرة الممرضة Pathological properties للكائن المعزول . وبعد الحصول على نتائج هـذه الدراسات والإختبارات تسجل فى لوحة تصنيف البكتيريا ، وبالرجوع إلى صفات البكتيريات الأخرى الشبيهة والتى سبق دراستها ووصفها وتصنيفها وتسميتها . يمكن تعيين نوع المزرعة النقية المجهولة .

ويمكن التعرف على درجة التشابه أو التطابق فى صفات السلالات بتقدير معامل يطلق عليه معامل التشابه Similarity coefficient طبقاً لمعادلة تعرف بمعادلة Sneath التى يتجاهل فيها الإختبارات ذات النتائج السلبية والمشتركة بين السلالتين التى تحت المقارنة . وفى هذه المعادلة يحسب عدد الاختبارات الإيجابية المشتركة بين كل من السلالتين مقسوماً على مجموع الصفات أو الاختبارات فى كلا السلالتين :

$$\text{معامل التشابه} = \frac{\text{أ}}{\text{أ} + \text{ب} + \text{جـ}}$$

أ = عدد الصفات أو الإختبارات الإيجابية النتائج المشتركة بين السلالتين تحت المقارنة .

ب = عدد الصفات أو الاختبارات الإيجابية النتائج الخاصة بأحد السلالتين.

جـ — عدد الصفات أو الإختبارات الايجابيةالنتائجالخاصة بالسلالة الأخرى .
ويفضل إحتساب معامل التشابه كنسبة مئوية ويطلق عليه حينئذ Similarity index فعندما تكون قيمته ١٠٠ ٪ فان ذلك يعنى تطابق تام بين السلالتين وعندما تكون قيمته صفر ٪ هذا يعنى عدم وجود تشابه إطلاقا .

وهناك معامل آخر يعرف باسم معامل التطابق Ma'ching coeffic,ent وفيه يؤخذ فى الإعتبار عدد الصفات أو الإختبارات السلبية النتائج.

ومن أهم المراجع التى يمكن الرجوع إليها فى هذا الصدد ، والتى تشمل تقسيم ووصف جميع البكتيريات المعروفة وهو مرجع برجى Bergey الخاص بتقسيم وتصنيف البكتيريات .

obeikandl.com

لوحة التعرف على نوع البكتيريا

اسم الباحث.................. مصدر العزل ....

تاريخ العزل .... رقم العزل ....

الشكل الظاهرى للخلايا الخضرية النامية على بيئة ....على.......°م

بعد .... يوم

شكل وتجمع الخلايا الخضرية .... حجم الخلايا ....

وجود أو غياب الجراثيم الداخلية .... حجم وموضع الجراثيم .....

اختبار الحركة .... الصبغ بطريقة جرام ....

صبغ الاسواط .... الصبغ المقاوم للاحماض ....

شكل المستعمرات النامية على بيئة........ على ....م° بعد ....يوم

الشكل .... الإرتفاع .... الحافة ....

السطح ....الصفات الضوئية..........................

النمو على الآجار المائل على بيئة .... على .... °م بعد....يوم

كمية النمو............... الشكل .... القوام ....

تكوين الصبغة .... الرائحة...............

النمو فى بيئة المرق المغذى على ....°م بعد ....يوم

النمو السطحى .... نمو تحت السطح..................

الراسب .... الكمية ....

تخمر المركبات الكربونية فى بيئة .... على .... °م

سكريات أحادية : أرابينوز ....رامنوز.......... زيلوز ....
جلوكوز .... فركتوز .... جالاكتوز........
مانوز ....
سكريات ثنائية : لاكتوز .... سكروز ....مالتوز ....
عديدة التسكر : رافينوز .... نشا .... دكسترين ....
جليكوجين ....
كحولات : جليسرين ....مانيتول .... سوربيتول.......
جلوكوسيدات : ساليسين .... Aesculiu ....

علاقة النمو بالأكسجين الجوى .... اختبار الكاتاليز ....
اختزال النترات .... اختبار الاندول ....
انتاج كبريتور الإيدروجين .... تحلل الجيلاتين ....
تحلل اليوريا .... تحلل النشا ....
اختبار فوجس بروسكاور وأحمر الميثيل ....
النمو فى لبن عباد الشمس ....

درجة الحرارة المثلى للنمو. . . . . . . .٥م درجة الpH المثلى للنمو . . . . .
درجة الحرارة الصغرى . . . . .٥م درجة الpHالصغرى . . . .
درجة الحرارة القصوى . . . . .٥م درجة الpHالقصوى . . . .

العلاقة الحيوية :

ممرضة للانسان .... ممرضة للحيوان ....
ممرضة للنبات .... مترممة ....
ذاتية التغذية .... علاقات أخرى ....

اختبارات إضافية خاصة

١٢

التطفر MUTAGENSIS

ان الإتجاه التجريبي نحو دراسة الوراثة بالبكتيريا كان دائماً موجهاً إلى دراسة قدرة البكتيريا على التطفر ، وذلك للتعرف على منشأ الطفرات ومسبباتها وتأثيرها على الجاميع البكتيرية . ومن أهم النتائج التي أسفرت عنها هذه الدراسة إظهار أن التصنيفات الوراثية التي تحدث للخلايا البكتيرية ترجع إلى التطفر والطفرات هي عبارة عن تغيرات تلقائية غير موجهة قد تحدث في المصممات (المحددات) النووية للصفات الوراثية . وتعتبر الطفرة حدث نادر وتظهر غالباً على معدل يتراوح بين ١×١٠-٤ إلى ١×١٠-١٠ لكل خلية بكتيرية لكل جيل . وهذا يعني أن خلية واحدة من كل ١٠٠٠٠ أو خلية واحدة من كل ١٠ بليون خلية تكون عرضة للتطفر .

وهناك أنواع كثيرة من الطفرات منها الطفرات المقاومة للفيرس البكتيري. أو المقاومة للمضادات الحيوية أو الإشعاعات الضارة أو الطفرات الكيموحيوية والتلوينية والطفرات المختلفة في القدرة المرضية ، أو تلك التي تؤثر على الشكل الظاهري للمستعمرات في معظم الأنواع البكتيرية [ناعمة Smooth (S) خشنة Rough (R) ومخاطية Mucoid (M)] .

ويفضل في مثل هذه الدراسات الوراثية التأكد من نقاء المزارع الطفرية المستعملة وذلك بعزل خلية واحدة فردية Single cell isolation ويجرى ذلك بالاستعانة بالميكروسكوب المجهز بأجهزة خاصة بالميكروما نيبيولاتور Micromanipulators غير أنه توجد طريقة ميكروسكوبية لاتعتمد على أجهزة خاصة لعزل الخلايا الفردية قد اتبعها De Vay and Schnathorst سنة ١٩٦٣ وتتم هذه الطريقة باتباع الخطوات الآتية :

١ – علم على حواف شريحة بقلم شمع .

٢ – افرد ٥ , – ١,٠ مل من زيت البارافين (المعقم) فوق سطح الشريحة فى صورة طبقة رقيقة. الشمع الموجود على حواف الشريحة يمنع الزيت من التساقط من على سطح الشريحة .

٣ – حضر معلق مخفف جداً من المزرعة . (٠,١ مل يخفف ٢ – ٣ مرات فى ١٠ مل ماء معقم) .

٤ – بواسطة أنبوبة شعرية دقيقة معقمة ، إدفع فقاقيع صغيرة (٥٠ ميكرون Micro-bubbles) إلى طبقة زيت البارافين . وتلاحظ هذه العملية باستعمال شيئيات ذات تكبير بسيط (٣,٥ أو ٥ ×) . (يفضل أن تسحب كمية من المعلق البكتيرى المخفف بالأنبوبة الشعرية بعد أن توصل بأنابيب مطاط .

٥ – افحص الفقاقيع الصغيرة باستعمال شيئيات تكبيرها ٤٣ × .

٦ – الفقاقيع التى تحتوى على خلايا مفردة تسحب بواسطة أنبوبة شعرية معقمة ثم تفرغ على سطح بيئة مناسبة لزرع البكتيريا . عادة يسحب بعض من الزيت مع النقطة ، لذلك يفضل أن تخطط النقطة الصغيرة على سطح الآجار.

٧ – فى خلال ٣ – ٤ يوم ستظهر مستعمرة صغيرة Micro colony على سطح الآجار ناشئة عن خلية مفردة .

عزل الطفرات المختلفة فى صفاتها المزرعية

قد يشاهد بالمزرعة ذات المستعمرات المتشابهة إختلاف فى واحد أو أكثر من مستعمراتها فى المظهر العام المميز للمزرعة . وقد يظن كثير من الفاحصين أن مثل هذه المستعمرات المختلفة ترجع إلى تلوث المزرعة واختلاطها : ولكن فى كثير من الأحيان تتكون هذه المستعمرات المختلفة فى صفاتها المزرعيـــة

نتيجة للتطفر . والتمرين التالى يهدف إلى التأكد من ثبات الشكل الظاهرى لمستعمرات نوع معين من البكتيريا .

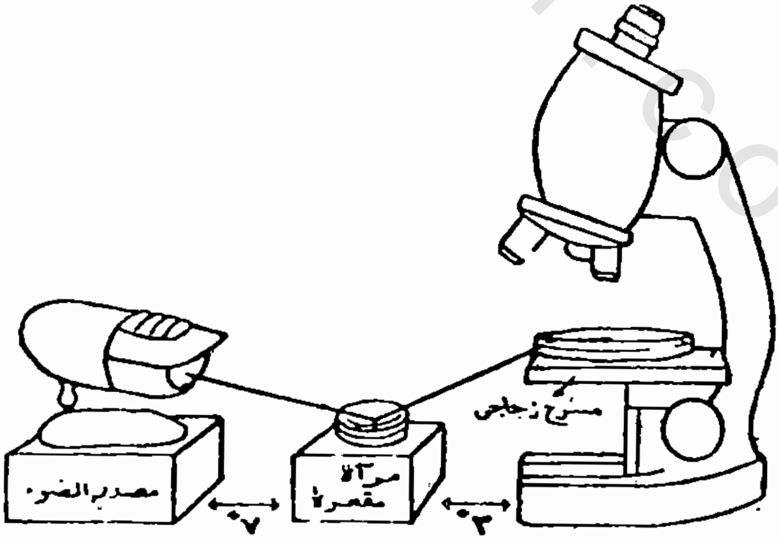
خطوات العمل :

١ ـ صب أطباق من بيئة آجار السكروز (آجار مغذى + ٥٪ سكروز)

٢ ـ لقح خمسة أطباق بمعلق مخفف من مزرعة لم يسبق تجديدها وأخرى بمعلق من مزرعة قديمة سبق تجديدها عدة مرات من البكتيريا *Erwinia amylovora*، وذلك بطريقة التخطيط البسيط .

٣ ـ ضع الاطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٧٢ ساعة .

٤ ـ إفحص المستعمرات النامية فى الاطباق بالعين المجردة ثم باستعمال مجهر تشريح له زوج من العدسات العينية Binocular dissecting microscope مع جعل الإضاءة تنفذ خلال المستعمرات بطريقة مائلة Obliquely transmitted كما هو مبين (بشكل ٤٤) .



(شكل ٤٤) : كيفية الحصول على الضوء المائل لغرض فحص المستعمرات البكتيرية .

٥ – صف المستعمرات النـاتجة فى كل حالة، لاحظ أن مستعمرات المزرعة التى لم يسبق تجديدها دائرية، محدبة لامعة، زبدية القـوام. ويسمى هذا النوع مـن المستعمرات نـاعمـة mooth (S) ، أما المستعمرات الناتجة عـن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات فـانـه علاوة على النوع السابق من المستعمرات يظهر نوعين آخرين :

(١) مستعمرات خشنة Rough (R)
وتتميز بأنها ذات حافة غير منتظمة وذات مظهر حبيبي مجعد جاف .

(ب) مستعمرات مخاطية Mucoid (M)
تتميز بأنها دائرية شديدة التحدب لزجة لامعة (شكل ٤٥) .

(شكل ٤٥) : مستعمرات ناعمة(S)و خشنة(R)و مخاطية(M) من البكتيريا *Erwinia amylovora* كما تشاهد بالعين المجردة

عزل طفرات مقاومة للمضادات الحيوية :

تسبب الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية مشاكل خطيرة فى علاج الامراض الميكروبيـة بواسطة المضادات الحيوية . وغالباً ما يؤخذ إحتمال حدوثها فى الاعتبار عند تحديد العلاج . وهناك عدة طرق لعزل الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية من مزارع البكتيريا أو من العينات التى تحضر من جسم الانسان أو الحيوان المصاب ، نذكر منها هنا طريقة الطبق المتدرج Gradient plate technique وخطوات هذه الطريقة تتلخص فيما يلى :

خطوات العمل :

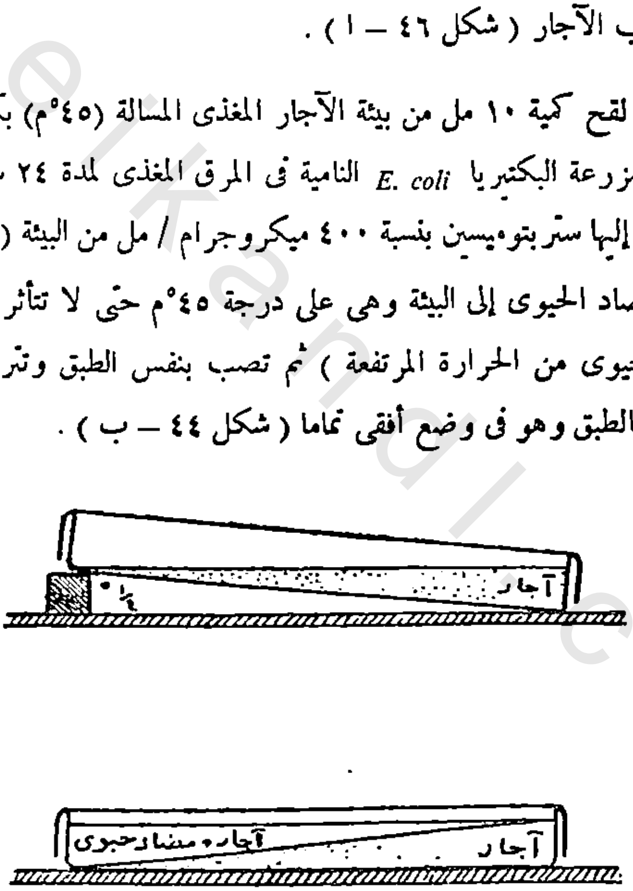
١ — صب ١٠ مل من بيئة الآجار المغذى المسال (٤٥°م) .

٢ — يترك الآجار ليتصلب بالطبق وهو فى وضع مائل بوضع أحد جانبي الطبق على قطعة من الخشب حتى يكون هذا الجانب مرتفعا عن الجانب الآخر أثناء تصلب الآجار (شكل ٤٦ — ا) .

٣ — لقح كمية ١٠ مل من بيئة الآجار المغذى المسالة (٤٥°م) بكمية ٠,١ مل مزرعة البكتيريا *E. coli* النامية فى المرق المغذى لمدة ٢٤ ساعة والمضاف إليها ستربتوميسين بنسبة ٤٠٠ ميكروجرام / مل من البيئة (يلاحظ إضافة المضاد الحيوى إلى البيئة وهى على درجة ٤٥°م حتى لا تتأثر فاعلية المضاد الحيوى من الحرارة المرتفعة) ثم تصب بنفس الطبق وتترك البيئة لتتصلب بالطبق وهو فى وضع أفقى تماما (شكل ٤٤ — ب) .

أ

ب

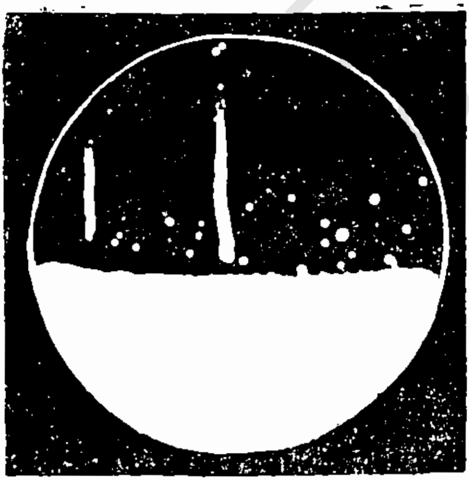


(شكل ٤٦) : طريقة الطبق المتدرج لاختبار تأثير المضادات الحيوية على نمو البكتيريا ولغرض عزل طفرات مقاومة للتركيزات المرتفعة منها .

٤ — ضع الأطباق بالحضان على درجة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة ثم افحص مايظهر على سطح الأجار من نموات . ويبين (شكل ٤٧) مايمكن أن يلاحظ :

(حيث أن المضاد الحيوى بطبقة الآجار العلوية سوف ينتشر إلى طبقة الآجار السفلية الخالية من المضاد الحيوى وأن درجة الانتشار سوف تؤدى إلى تخفيف تركيز المضاد الحيوى فى الطبقة العليا ، ويتوقف التخفيف على نسبة سمك طبقتى الآجار العليا والسفلى ، لذلك فان تركيز المضاد الحيوى سيكون متدرجاً بالطبق) .

٥ — فى حالة ظهور مستعمرات مفردة بعيداً عن المنطقة ذات النمو المتزاحم فان ذلك دليل على أن خلايا هذه المستعمرات المفردة مقاومة للتركيزات المرتفعة من المضاد الحيوى . وللتأكد من ذلك يفرد نمو بعض هذه المستعمرات تجاه التركيزات الأكثر ارتفاعا بالطبق، ثم يترك الطبق بالحضان لمدة ١٨ ساعة يفحص بعدها ، وجود نمو مستمر على امتداد خط الفرد يدل على أن هذه المستعمرة تنتج نمو طفرة مقاومة للتركيزات المرتفعة من المضاد الحيوى (شكل ٤٧) .



(شكل ٤٧) : نمو طفرات من البكتيريا *E. coli* على طبق متدرج التركيز من المضاد الحيوى .

عزل الطفرات المختلفة فى قدرتها المرضية

باستمرار زرع البكتريا *Pseudomonas solanacaerum* (المسببة لمرض العفن البنى فى البطاطس) على البيئات الصناعية فان ذلك يؤدى إلى إضعاف قدرتها المرضية للنبات أو إلى فقد هذه القدرة نهائياً . ويعزى ذلك إلى أن المزرعة الأصلية ذات القدرة الممرضة المرتفعة Virulent تظهر بها طفرات غير قادرة على إحداث المرض Avirulent وأن هذه الطفرات يزداد تعداد أفرادها فى المزرعة على حساب السلالة الأصلية لتحملها ظروف المزرعة أكثر من السلالة الأصلية الممرضة وكذلك لقدرتها على إحداث تثبيط فى نمو السلالة الممرضة. وقد تمكن كلمان Kelman فى سنة ١٩٥٤ من إيجاد طريقة تسهل التمييز بين السلالات الممرضة وغير الممرضة من هذه البكتريا بالزرع على بيئة التيترازوليم Tetrazolium التفريقية .

ويلاحظ أن أملاح التيترازوليم ذائبة فى الماء وعديمة اللون . عندما تختزل تتحول إلى مواد ملونة غير ذائبة وهى الفورمازان Formazans وعلى ذلك فان اختزال التيترازوليم يدل على نشاط الانزيمات المزيلة للايدروجين Dehydrogenases وقد وجد كلمان أن السلالات الممرضة تظهر بيضاء اللون وغير الممرضة تظهر بلون أحمر مع حافة شفافة .

خطوات العمل :

١ - صب أطباق من بيئة التيترازوليم التفريقية (آجار مغذى + ٢ ٪ جلسرين + ٠,٠٠٥ ٪ Triphenyl tetrazolium chloride) .

٢ - لقح بعض من الاطباق بمعلق مخفف من مزرعة حديثة العزل من النبات ولم يسبق تجديدها ومجموعة أخرى من الاطباق من مزرعة قديمة

سبق تجديدها عدة مرات من البكتيريا *P. solanacearum* وذلك بطريقة التخطيط البسيط .

٣ – ضع الاطباق فى الحضان (٣٠°م) لمدة ٤٨ ساعة .

٤ – إفحص المستعمرات النامية فى الأطباق .

٥ – صف المستعمرات الناتجة فى كل حالة . لاحظ أن مستعمرات المزرعة الحديثة والتى سبق تجديدها بيضاء وغير منتظمة وسائلة Fluidal (شكل ٤٨) أما المستعمرات الناتجة عن مزارع قديمة سبق تجديدها عدة مرات فانه يظهر علاوة على النوع السابق من المستعمرات نوع آخر من المستعمرات الطفرية يتميز بأنه مستدير وزبدى القوام ولونه أحمر غامق مع وجود حافة ضيقة شفافة (شكل ٤٨)

(شكل ٤٨) : مستعمرات البكتيريا *Pseudomonas solanacearum* على بيئة التترازوليم التفريقي . لاحظ مستعمرات السلالة الممرضة (V) البيضاء وغير المنتظمة . أما مستعمرات السلالة غير الممرضة (aV) تكون مستديرة وحمراء اللون مع وجود حافة ضيقة شفافة.

obeikandi.com

٦ — إجرى عدوى صناعية على نباتات بطاطس وطماطم تنمو فى تربة معقمة فى إصص معقمة . وتجرى العدوى الصناعية بوخز الساق بابرة تشريح معقمة وعليها جزء من النمو البكتيرى . تلقح مجموعة من النباتات بلقاح من النوع الأول من المستعمرات (بيضاء) ومجموعة أخرى بلقاح من النوع الثانى من المستعمرات (حمراء) وتوخز مجموعة من النباتات بإبرة تشريح معقمة وتترك للمقارنة . تترك النباتات فى الجو العادى على درجة ٢٨°م .

٧ — نباتات الطماطم والبطاطس الملقحة بالمستعمرات البيضاء تذبل تماماً بعد ٥و٧ أيام على التوالى فى حين أن مثل هذه النباتات الملقحة بالمستعمرات الحمراء وكذلك نباتات المقارنة لم يحدث لها ذبول أو أى أعراض مرضية فى نفس هذه المدة (شكل ٤٩) .

(ج) (ب) (أ)

(شكل ٤٩) : نباتات طماطم ملقحة صناعيا بسلالتين من البكتيريا *Pseudomonas solanacearum* بعد ٥ أيام من التلقيح .

ا — مقارنة ب — ملقحة بنمو من المستعمرات السلالة غير الممرضة .

حـ — ملقحة بنمو من مستعمرات السلالة الممرضة .

Obeikandi.com

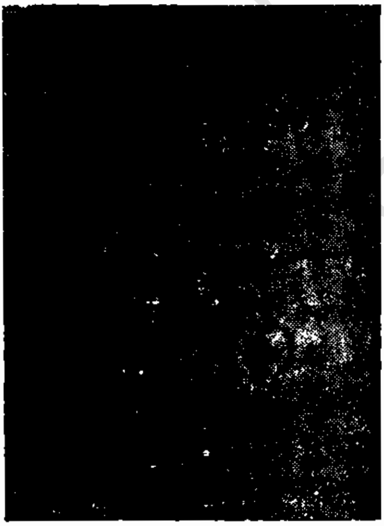
بعض الكائنات الحية الدقيقة الاخرى

غير البكتيريات الحقيقية

الغرض من هذا التمرين هو التعرف على بعض المجموعات الرئيسية للأحياء الدقيقة الأخرى غير البكتيريات الحقيقية والتى كانت محور الدراسة فى المواضيع السابقة حتى يمكن للدارس أن يلم ببعض الصفات الرئيسية المميزة لكل مجموعة .

١ – الاسبيروكيتات Spirochaete

بكتيريات رفيعة جداً (شكل ٥٠) لدرجة أنها لا تشاهد بسهولة بالميكروسكوب الضوئى إلا إذا إستعملنا طريقة الحقل المظلم Dark ground illumination فتظهر بشكل حلزونى مميز Spiral يصعب صبغها بصبغات الأنيلين المعتادة . و تتميز باختزالها لنترات الفضة إلى فضة معدنية Metallic silver وتستعمل هذه الظاهرة لصبغها بطريقةفونتانا Fontana



(شكل ٥٠) : صورة ميكروسكوبية للبكتيريا *Treponema* sp.

وتتلخص خطواتها فيما يلى :

١ – حضر معلق من المواد المتحصل عليها من بين قواعد الأسنان بواسطة

الكشط بابرة معقمة . حضر غشاء من المعلق على شريحة نظيفة وانتظر حتى يجف فى الهواء .

٢ - عامل الغشاء ٣ مرات كل واحدة ٣٠ ثانية بمثبت الفونتانا Fontana's fixative .

٣ - إغسل المثبت بكحول مطلق وأترك الكحول ٣ دقائق على الغشاء .

٤ - أزل الزيادة من الكحول بعناية فأتقة . إجعل الزيادة من الكحول تجف على اللهب بسرعة .

٥ - ضع معمق فونتانا Fontana's mordant على الغشاء . سخن حتى يتصاعد البخار وترك ٣٠ ثانية .

٦ - إغسل جيداً بماء مقطر ثم أترك الشريحة لتجف .

٧ - عامل بمحلول فضة الفونتانا Fontana's silver solution وسخن حتى يتصاعد البخار . أترك المحلول ٣٠ ثانية أو حتى يصبح الغشاء بنى اللون.

٨ - إغسل بالماء المقطر . جفف فى الهواء وحمل فى كندا بلسم مع استعمال غطاء شريحة رقيق إفحص بالعدسة الزيتية تشاهد البكتيريات الآتية :

أ - *Treponema microdentium* حلزونات قصيرة نسبيا (٣ - ٤ ميكرونات فى الطول و ٢٥, . ميكرون فى العرض) .

ب - *T.macrodentium* حلزونات طويلة نسبيا (٣-٨ ميكرونات فى الطول و ٧, - ١,٠ ميكرون فى العرض) .

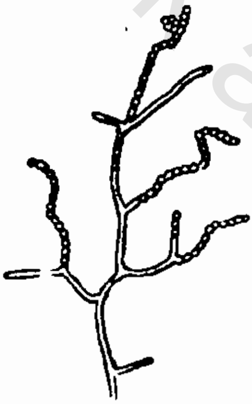
٢ - الاكتينوميسيتات Actinomycetes

تتبع هذه المجموعة رتبة من رتب البكتيريا *Or. Actinomycetales* وتتميز بتكوين

خلايا مستطيلة ذات ميل إلى التفرع الحقيقى ، والتى تشبه كثيراً هيفات الفطر إلا أنها تتميز عنها بدقة حجمها حيث لايزيد قطرها عن ١,٥ ميكرون وفى المتوسط ١ ميكرون أو أقل . ويتميز الجنس *Streptomyces* (شكل ٥١) بتكوين ميسليوم كثير التفرع مكونا جراثيم كونيدية تحمل فى سلاسل مستقيمة أو منحنية على نهاية هيفاته الهوائية Aerial hypha .

وتوجد الاكتينوميسيتات بكثرة فى التربة وتلعب دوراً هاما فى تحليل المادة العضوية كما أن بعضاً منها ممرض للانسان والحيوان والنبات والبعض الآخر منها يستغل فى إنتاج المضادات الحيوية .

إفحص مستعمرة البكتيريا *Steropmyces* sp. والنامية على بيئة آجار الجلوكوز .



(شكل ٥١) : رسم تخطيطى للبكتيريا *Streptomyces* sp. يبين التفرعات وطريقة التجرثم .

حضر غشاء من النمو وإصبغه بصبغة جرام ثم إفحصه بالعدسه الزيتية مع كتابة الأجزاء على الرسم وتوجد طريقة أكثر دقة لصبغ الاكتينوميستات (طريقة Henrici) .

وتتم بوضع نقطة بيئة آجار مسال على شريحة واتركها لتبرد بدون أن تتصلب (تحت ظروف معقمة) . لقح هذه بمزرعة من الأكتينو ميسيتات . أنشر نقطة الآجار لتكون غشاء رقيق على الشريحة . يمكن أن يترك الآجار ليتصلب أولا بعد عمل الغشاء ثم يلقح بعد ذلك بابرة حادة . حضن الشريحة فى غرفة رطبة معقمة Sterile moist chamber . بعد النمو أترك الشريحة لتجف ثم ثبت بالكحول وأصبغ كل المستعمرة الصغيرة مع الميسليوم الخضرى والهوائى . لاحظ أن يتم الصبغ تحت ظروف غير مشوشة أو مضطربة .

الدراسات

٣ — الطحالب Algae

نباتات بسيطة بدون جذور أو سيقان أو أوراق . معظم الطحالب تحتوى على كلوروفيل لذلك فهى ذاتية التغذية . يتراوح حجم الطحالب من خلايا مفردة فى حجم البكتيريا إلى بعض الطحالب البحرية عديدة الخلايا والتى يصل طولها إلى بضع أقدام (١ ميكرون إلى عديد من الأقدام) والمواطن الطبيعية للطحالب هى المحيطات والبحيرات والبرك كما توجد أيضاً فى التربة وعلى الصخور والأشجار .

إفحص وارسم الشريحة المجهزة للطحلب *Nostoc* (شكل ٥٢) والطحلب *Spirogyra* بالقوة الكبرى مع كتابة الأجزاء على الرسم .

(شكل ٥٢) : رسم تخطيطى للطحلب *Nostoc* الذى يتكون من سلسلة من الخلايا وتوجد أيضاً خلايا متسعة عديمة اللون كروية أو برميلية الشكل تسمى حويصلات متباينة Heterocysts .

٤ — الفطريات Fungi

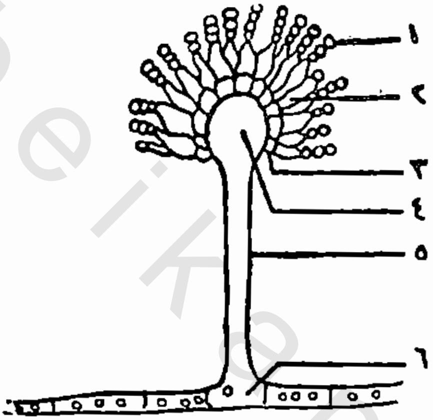
نباتات بسيطة يتراوح حجمها من خلايا مفردة ميكروسكوبية مثل الخميرة Yeast (٥ — ١٠ ميكرون) إلى فطريات خيطية ميكروسكوبية عديدة الخلايا (سمك الخلايا ٥ خمسة ميكرون أو أكثر) إلى فطريات عديدة الخلايا كبيرة الحجم يمكن مشاهدتها بالعين المجردة مثل فطر عيش الغراب .

والفطريات لا تحتوى على كلوروفيل لذلك فهى غير ذاتية التغذية . والفطريات منتشرة انتشاراً واسعاً فى الطبيعة فهى توجد نامية على الخشب والورق والقماش والجلد والفاكهة والخضر وفى التربة . وتسبب أمراضا للنبات

obeikandl.com

والحيوان والانسان إلا أنها قد تكون ذات فائدةعظيمة فبعضها يحلل المادة العضوية فى التربة ، كما يستعمل البعض الآخر فى عمليات صناعيةهامة مثل إنتاج الكحولات والخمور والمضادات الحيوية .

(شكل ٥٣) : صورةميكرسكوبية تبين تبرعم الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* لاحظ وضوح النواة



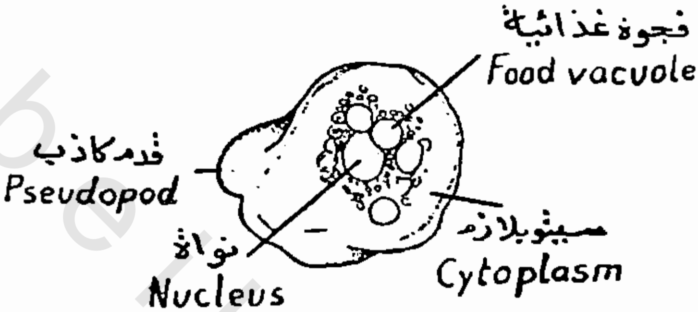
(شكل ٥٤) : رسم تخطيطى للفطر *Aspergillus niger* ١ – جراثيم كونيدية Conidium (a) ٢ – ذنيبات ثانوية Secondary sterigma (ata) ٣ – ذنيبات أولية Primary sterigma (ata) ٤ – مثانة Vesicle ٥ – حامل كونيدى Conidiophore ٦ – خلية القدم Foot cell .

إفحص الشريحة المجهزة للخميرة *Saccharomyces cevevisiae* (شكل ٥٣) والفطر *Aspergillus niger* (شكل ٥٤) والفطر بنيسيليوم *Penicillium* sp. بالقوة الكبرى . اسم التحضيرات مع كتابة الأجزاء على الرسم .

٥ – البروتوزوا Protozoa

البروتوزوا هى حيوانات بسيطة وحيدة الخلية كما أنها عادة ميكروسكوبية الحجم (٢ — ٢٠ ميكرون) وهى منتشرة كغيرها من الكائنات الدقيقة فى

كل مكان بالطبيعة . كما أنها توجد فى أمعاء الحيوانات وبعضا منها تسبب أمراضاً للانسان .



(شكل ٥٥) : رسم تخطيطى يبين التركيبات الرئيسية للاميبا Amoeba

افحص الشريحة المجهزة للأميبا Amoeba بالقوة الكبرى (شكل ٥٥) ارسم التحضير مع كتابة الأجزاء على الرسم.

obeikandl.com

بعض التطبيقات الزراعية لعلم البكتيريا

نظراً لتشعب التخصصات الزراعية وللدور الذى تلعبه البكتيريا فى بعض هذه التخصصات بدرجة تؤثر على مستوى الانتاج الزراعى ، فقد أفردت دراسات بكتيريولوجية معينة تميز كل تخصص . فهناك بكتيريولوجيا الأراضى ، وبكتيريولوجيا الألبان ، وبكتيريولوجيا الصناعات الغذائية ، والبكتيريولوجيا النباتية (أمراض النبات) ، والبكتيريولوجيا البيطرية . وفيما يلى نموذج من بعض التمارين العملية التى تدرس ببعض هذه التخصصات الدقيقة .

أولا – البكتيريا النباتية (البكتريا الممرضة للنبات) Phytobacteriology

تصاب النباتات بعديد من الأحياء الدقيقة مسببة لها أمراضاً مختلفة ، ويمكن تقسيم هذه الامراض تبعاً لمسبباتها إلى أمراض بكتيرية وأمراض فيروسية ، وأمراض فطرية وأمراض تتسبب عن الإصابة بالديدان الثعبانية . والتمرين التالى يوضح دور البكتيريا كمسببات مرضية هامة للنبات .

خطوات العمل :

١ – حضر مزارع حديثة من البكتيريات *Erwinia carotovora* و *Agrobacterium tumefaciens* و *E. coli*, (٤٨ ساعة) .

٢ – اغسل جيداً جذر سليم من الجزر ثم عقمه تعقيماً سطحياً وذلك بغمره فى محلول سليمانى لمدة ٥ دقائق ثم اغسله بالماء المعقم عدة مرات . ويفضل علاوة على التعقيم السطحى الكيماوى أن يعاد تعقيم الجذر بطريقة التلهيب الكحولى لضمان التخلص من الملوثات السطحية :

٣ – قطع الجزر بشكل شرائح ذات سمك لايقل عن ١ سم بالاستعانة

بمشرط وملقط معقمين ثم ضعها فى أطباق بترى معقمة (شريحة بكل طبق) . يحتوى كل طبق على كمية ٣ — ٥ سم٣ ماء معقم ليحفظ شرائح الجزر من الجفاف (لاحظ أن لايغمر الماء بالطبق سطح الشريحة) .

٤ — لقح سطح شريحة الجزر فى أحد الاطباق بالبكتيريا *E. carotovora* وفى الثانى بالبكتيريا *A. tumefaciens* وفى الثالث بالبكتيريا *E. coli* واترك الرابع للمقارنة .

٥ — ضع الاطباق فى الحضان على درجة ٢٥°م لمدة ٢ أسبوع .

٦ — افحص الاطباق دوريا كل ٤٨ ساعة ثم دون ملاحظاتك عن مظهر الشرائح فى كل حالة .

(فى حالة الطبق الأول يحدث عفن طرى لشريحة الجزر خلال ٤٨ ساعة من التلقيح ، وفى الطبق الثانى فسوف تتكون أنسجة تورمية على سطح شريحة الجزر بعد فترة تتراوح بين ١٠ — ١٤ يوما من التلقيح ، وفى الطبق الثالث والرابع لن يحدث أى تغير مرضى فى الأنسجة) .

٧ — دون استنتاجك من النتائج التى تتحصل عليها .

ثانيا — بكتيريا التربة Soil bacteriology

دراسة البكتيريا العقدية

تشترك بعض البكتيريات من جنس *Rhizobium* مع جذور النباتات البقولية فى تثبيت الآزوت الجوى بطريقة تكافلية Symbiotic nitrogen fixation ونتيجة لمعيشة هذه البكتيريا على جذور النباتات تظهر على الجذور عقداً مختلفة الشكل والحجم هى عبارة عن نموات من الجذور تحوى بداخلها خلايا البكتيريا . ولهذه العلاقة أهمية من الناحية الزراعية حيث أنها توفر على المزارع

القيام بتسميد محاصيله البقولية بالأسمدة الآزوتية . علاوة على تأثيرها فى زيادة خصوبة التربة .

خطوات العمل :

١ – افصل عقدة جذرية من جذر نبات بقولى وضعها بأنبوبة تحتوى على محلول سليمانى لمدة ٣ دقائق .

٢ – ترفع العقدة بواسطة ملقط معقم ثم تغسل جيدا بالماء المعقم عدة مرات .

٣ – تنقل العقدة إلى طبق بترى معقم به حوالى ٣ مل ماء معقم ، وتهرس العقدة بواسطة إبرة تشريح ومشرط معقمين .

٤ – يستعمل المعلق الناتج فى تحضير أغشية ، وذلك بأخذ ملء عقدة من إبرة تلقيح معقمة وفرده على سطح شرائح نظيفة .

٥ – يترك الغشاء يجف فى الهواء ، ثم يثبت بالحرارة .

٦ – بعد أن تبرد الشريحة أصبغ الغشاء بصبغة الأرثروسين الفينوليـــة Carbol erythrosin لمدة ٥ دقائق .

٧ – تغسل الشريحة بالماء وتترك لتجف ثم تفحص بالعدسة الزيتية .لاحظ أن الأشكال المختلفة للخلايا البكتيرية المفحوصة والتى تسمى لذلك بالبكتيرويدات Bactero ides (شكل ٥٦) .

(شكل ٥٦) : أشكال مختلفة للبكتيرويدات.

٨ – صب بيئة أحمر الكونجو Congo red medium (أنظر ملحق البيئات) فى أطباق بترى معقمة واتركها تتصلب .

٩ – لقح سطح آجار أحمر الكونجو بواسطة تخطيطه بمعلق البكتريا السابق تجهيزه .

١٠ — ضع الأطباق بالحضان (٣٠°م) لمدة ٤ — ٧ أيام . إفحص بعدها النمو الناتج (لاحظ أن مستعمرات *Rhizobia* تكون مستديرة مرتفعة لامعة بيضاء تصبح طباشيرية بزيادة عمر المستعمرة) .

١١ — حضر غشاء من المستعمرات الناتجة وثبته حرارياً . ثم أصبغه بطريقة جرام وافحصه ميكروسكوبيا .

١٢ — قارن شكل الخلايا الناتجة فى هذه الحالة بالبكتيرويدات السابق فحصها .

ثالثا — بكتيريا الألبان Dairy Bacteriology

(١) دراسة بكتيريا حمض اللاكتيك :

هناك بعض البكتيريات لها القدرة على مهاجمة سكر اللبن وتنتج حمضا يعرف بحمض اللاكتيك . وقد يكون ناتج تخمر السكر حمض لاكتيك فقط فتسمى البكتيريا وحيدة التخمر Homofermenters أو يكون حمض اللاكتيك مختلطا بنواتج تخمر أخرى فتعرف بالبكتيريا المختلطة التخمر Heterofermenters . وتستغل بكتيريا حمض اللاكتيك فى تصنيع الألبان وخاصة فى صناعة الألبان المتخمرة مثل اللبن الزبادى . ولصناعة اللبن الزبادى تستعمل بادئات هى عبارة عن لقاح يؤخذ من لبن زبادى قديم يحتوى على بكتيريا حمض اللاكتيك المسئولة عن التخمر .

خطوات العمل :

١ — حضر غشاء من بكتيريا حمض اللاكتيك وذلك بأخذ جزء صغير من لبن زبادى قديم واخلطه بنقطة من الماء المعقم على سطح شريحة نظيفة ثم افرده على سطح الشريحة .

٢ ــ أترك الغشاء ليجف فى الهواء ثم ثبته بالحرارة .

٣ ــ بعد أن تبرد الشريحة اغسل الغشاء فى الزيلول للتخلص مما يكون بالتحضير من مواد دهنية .

٤ ــ اغسل الشريحة بالكحول للتخلص من آثار الزيلول والمواد الدهنية الذائبة .

٥ ــ اغسل الشريحة بالماء الجارى .

٦ ــ أصبغ الغشاء بصبغة جرام ثم افحصه بالعدسة الزيتية . (لاحظ أن بالتحضير نوعين من البكتيريا الموجبة لصبغة جرام ، عصوية فى سلاسل ، تمثل الجنس *Lactobacillus* ، وأخرى كروية فى سلاسل تمثل الجنس *Streptococcus*.

(ب) أختبار تلوث اللبن المبستر والمياه :

عادة يدل وجود بكتيريا القولون Coliform bacteria على درجة تلوث اللبن أو مياه الشرب . وفى حالة اللبن المبستر فان وجود هذه الكائنات به يدل على عدم كفاءة عملية البسترة أو إلى حدوث تلوث للبن بعد بسترته . وهناك إختبارات قياسية للتعرف على مدى نظافة اللبن والمياه وخلوها من هذه الكائنات التى قد يكون لوجودها دلالة على وجود تلوثات بكتيرية ممرضة للانسان .

١ ــ تقدير عدد الخلايا البكتيرية :

قدر عدد الخلايا البكتيرية فى عينة اللبن أو عينة الماء باستعمال طريقة العد بالأطباق المصبوبة السابق ذكرها صفحة .

٢ــ الاختبار التخمينى لوجود بكتيريا القولون . Presumptive test for coliforms

١ ــ استعمل نفس العينة فى تلقيح ٥ أنابيب مرق اللاكتوز مضاعفة

التركيز وذلك بوضع ١٠ مل من العينة لكل أنبوبة ، فى حالة عينات المياه . وبيئة مرق الببتون المضاف إليها أملاح الصفراء وسكر اللاكتوز ودليل أخضر الزاهى Brilliant green lactose bile broth فى حالة عينات اللبن وضعها فى الحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ — ٤٨ ساعة . لاحظ تكون غاز بعد ٢٤ ساعة فى البيئة المستعملة .

٢ — إذا لم يتكون غاز ضع الأنابيب فى الحضان مرة أخرى لمدة ٢٤ ساعة .

٣ — إذا لم يتكون غاز فى الأنابيب بعد فترة التحضين الثانية فهذا يعنى خلو العينات من بكتيريا القولون (أختبار تخمينى سالب) .

٤ — أما إذا تكون غاز فى أى أنبوبة من الخمس المستعملة خلال ٤٨ ، ساعة يمكن اعتبار الاختبار موجباً (دليل وجود بكتيريا القولون) .

٣ — الاختبار التأكيدى : Confirmed test

١ — لقح بطريق التخطيط البسيط سطح بيئة آجار الأيوسين وأزرق الميثلين (EMB) Eosin methylene blue agar بلقاح من أحد مزارع مرق اللاكتوز والتى تكون بها غازات .

٢ — ضع الأطباق على درجة ٣٧° لمدة ٢٤ ساعة .

٣ — أفحص المستعمرات النامية بالأطباق . فى حالة وجود مستعمرات البكتيريا *E. coli* فانها تكون مستديرة ، قطرها ٢ — ٣ مم ، ومرتفعة قليلا ، ذات مركز أسود وبريق معدنى مخضر Greenish metallic sheen أما فى حالة وجود مستعمرات البكتيريا *Aerobacter aerogenes* فهى تظهر مستديرة محدبة ذات قطر ٤ — ٦مم ، وتبدو المستعمرات عادة متزاحمة بمعنى أنها لا

تشاهد منعزلة عن بعضها ، وهى ذات مركز بنى غامق تبدو مخاطية نصف شفافة خالية من البريق المعدنى . وجود مستعمرات البكتريا *E. coli* يعتبر ، اختبار تأكيدى موجب ، إذ أن وجود هذه البكتريا دليل على تلوث عينة المياه بمياه المجارى ، أما وجود البكتريا *Aerobacter aerogenes* وهى من بكتيريات التربة فليس دليلا على تلوث العينة بمياه المجارى

٤ — الاختبار التكميلى Completed test

١ — لقح أنبوبة تحتوى على مرق اللاكتوز وأنبوبة آجار مائل بجزء من مستعمرة تنطبق عليها صفات مستعمرات البكتريا *E. coli*

٢ — ضع الأنابيب فى الحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ — ٤٨ ساعة

٣ — افحص مزارع مرق اللاكتوز للتأكد من تكون الغاز

٤ — حضر غشاء من النمو البكتيرى الناتج بأنبوبة الآجار المائل واصبغه بصبغة جرام .

٥ — افحص الغشاء بالعدسة الزيتية . تكون غاز فى مرق اللاكتوز ووجود خلايا عصوية سالبة لجرام غير متجرثمة فى الغشاء المحضر والمصبوغ يعتبر اختبار تكميلى مقنع للاختبارات السابقة . ويحكم على العينة بأنها ملوثة .

التفرقة بين البكتيريا Escherichia coli والبكتيريا Aerobacter aerogenes

رغماً من التشابه الكبير بين البكتيريا *E. coli* والبكتيريا *A.aerogenes* فى كثير من صفاتهما ، إلا أنهما يختلفان عن بعضهما فى عدد قليل من الصفات تتخذ كأساس للتفرقة بينهما . ويستعمل إختبار الاندول ، وأحمر الميثيل وفوجس بروسكاور ، والسترات والتى تعرف فى مجموعها (IMVIC) للتفرقة بين هاتين البكتيريتين علاوة على الاختبار التأكيدى السابق وصفه . ولما قد سبق

وصف كل من طريقة اختبار الاندول وأحمر الميثيل وفوجس بروسكاور فان اختبار السترات Citrate test يجرى كما يلى :

١ - تنمى البكتيريا على بيئة السترات (أنظر ملحق البيئات) وهى بيئة محددة التركيب الكيماوى تحتوى على سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون.

٢ - وحيث أن البكتيريا *A.aerogenes* تستطيع النمو فى وجود سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون فى حين أن البكتيريا *E. coli* لا يمكنها ذلك ، فيمكن عن هذا الطريق التفرقة بينهما . والجدول التالى يوضح الفروق بين البكتيريا *E. coli* والبكتيريا *A. aerogenes* .

الاختبار	*E. coli*	*A aerogenes*
الأندول	موجب	سالب
أحمر الميثيل	موجب	سالب
فوجس - بروسكاور	سالب	موجب
السترات	سالب	موجب

رابعا - بكتيريا الأغذية

(ا) أختبار كفاءة تعقيم المعلبات

فى مصانع حفظ الأغذية تجرى اختبارات على الأغذية المعلبة للتأكد من خلوها من الكائنات الملوثة والمفسدة للمادة الغذائية المحفوظة ، ولاجراء ذلك تتبع الخطوات الآتية :

obeikandl.com

١ – توضع بعض العلب فى الحضان على درجة ٣٧°م لمدة ٧ – ١٠ يوم والبعض الآخر فى حضان على درجة ٥٥°م لنفس المدة .

٢ – يجرى فحص العلب على فترات منتظمة لملاحظة حدوث أى انتفاخ بها . إذا لم يحدث انتفاخ كان ذلك دليلا على كفاءة التعقيم وخلو المادة الغذائية من الملوثات .

٣ – عند حدوث انتفاخ بأى علبة ، تزال هذه العلبة من الحضان ويجرى فحصها ميكروبيولوجيا كما يلى :

(ا) تسجل حالة العلبة المنتفخة من الخارج

(ب) تنظيف العلبة من الخارج بالماء والصابون وتعقم فى أماكن فتحها (قاع العلبة) باستعمال محلول سليمانى ٠,١٪ أو فينول ٥٪ . يراعى بعد ذلك غسل المنطقة المعقمة بقطعة من القطن المبللة بالماء المعقم .

(جـ) فى حالة الأغذية السائلة يعمل ثقب بقاعها أما فى حالة الأغذية الصلبة فتفتح بازالة قرص دائرى بواسطة فتاحة العلب المعقمة .

(د) تلقح أربع أنابيب من بيئة مرق الدكستروز – تربتون المضاف إليها دليل بروموكريزول الأرجوانى بحوالى ٢ جرام أو ١ مل من الغذاء لكل أنبوبة وتوضع نصف الأنابيب بالحضان على درجة ٣٧°م والنصف الآخر على درجة ٥٥°م لمدة ٢ – ٣ يوم .

(هـ) تغلى ٤ أنابيب من بيئة مرق التربتون وتترك لتبرد ثم تلقح كل منها بحوالى ٢ جرام أو ١ مل من الغذاء لكل أنبوبة ثم يصب فوقها ٥مل من مزيج فاسبار . توضع الأنابيب بالحضان كما فى د.

(و)تفحص الأنابيب وتسجل التغيرات التى تتم بها ثم يجرى عمل أغشية

من النمو الناتج وصبغها بصبغة جرام للتأكد من المجاميع البكتيرية الملوثة للغذاء .

(ب) التسمم الغذائى البكتيرى :

قد ينشأ عن تلوث الأغذية بأنواع معينة من البكتيريا حدوث تسمم . للانسان الذى يتناول هذه الأغذية الملوثة . ومن أمثلة البكتيريات التى تسبب تسمم غذائى البكتيريا *Clostridium botulinum* المسببة للتسمم البوتشيوليني وعند الاشتباه فى حدوث تسمم غذائى من هذا النوع فى عينة من مادة غذائية يجرى الآتى :

أولا — التأكد من وجود السم :

١ — حضر مستخلص مائى للغذاء ثم يفصل السائل عن المواد الصلبة بالقوة المركزية الطاردة .

٢ — عقم السائل بالترشيح .

٣ — احقن ١ر — ٠,٥ مل من الراشح فى جسم فأر تجارب (يمكن الاستعاضة عن الحقن بتغذية الفأر بـ٢ — ٥ مل من الراشح بعد خلطه بغذائه) . فى حالة وجود تركيز عالى من السم يموت الفأر فى خلال ساعات من الحقن أو من التغذية على الغذاء المسمم ، أما إذا كان تركيز السم منخفضاً فقد يموت الفأر بعد ٣ — ٤ أيام من حقنه أو تغذيته .

ثانياً — عزل الخلايا الحية :

١ — لقح بيئة آجار مستخلص اللحم بلقاح من العينة الغذائية الملوثة .

٢ - يراعى أن يتم التحضين فى ظروف غير هوائية لمدة ٢ - ٣ يوم على درجة حرارة ٣٧°م (هذا النوع من البكتيريا غير هوائى إجباراً) .

٣ - حضر غشاء مصبوغ بجرام من المستعمرات الناتجة تحت ظروف غير الهوائية للتعرف على وجود البكتيريا العصوية الموجبة لجرام والتى تحتوى على جراثيم طرفية أو تحت طرفية والمميزة للجنس *Clostridium*

obeikandi.com

ملحق ١

البيئات الغذائية

آجار ايوسين أزرق الميثيلين

بيتون	١٠ جرام
لاكتوز	١٠ جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٢ جرام
آجار	٢٠ جرام
أيوسين	٠,٤ جرام
أزرق الميثيلين	,٠٦٥ جرام
مـاء مقطر	١ لـتر

ال pH النهائى ٧,١

أجار تشابك دوكس

تستعمل عادة لزرع الفطريات

سكروز	٠، جرام
نترات صوديوم	٣ جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١ جرام
كبريتات مغنسيوم	,٥ جرام
كلوريد بوتاسيوم	,٥ جرام
كبريتات حديدوز	,٠١ جرام
آجار	١٥—٢٠ جرام
مـاء مقطر	١ لـتر

obeikandi.com

اجار جلوكوز

مستخلص لحم	٣ جرام
ببتون	٥ جرام
جلوكور	١٠ جرام
آجار	٢٠ جرام
مـاء مقطر	١ لتر

اجار دكستروز البطاطس

تستعمل عادة لزرع الفطريات

مستخلص مائى لـ ٢٠٠ جرام من البطاطس

دكستروز	٢٠ جرام
آجار	٢٠ جرام
مـاء مقطر	١ لتر

اجار مغذى

مستخلص لحم	٣ جرام
ببتون	٥ جرام
آجار	٢٠ جرام
مـاء مقطر	١ لتر

أحمر الكنغو

مانيتول	١٠ جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٠,٥ جرام
كبريتات مغنسيوم	٠,٢ جرام

obeikandi.com

كربونات كلسيوم ٣ جرام

كلوريد صوديوم ٠,١ جرام

مستخلص خميرة ١ جرام

أحمر كنغو (١ : ٤٠٠ محلول مائى) ١٠ مـل

آجار ٢٠ جرام

مـاء مقطر ١ لـتر

أوملیانسکی

كبريتات أمونيوم ١ جرام

فوسفات بوتاسيوم ثنائية ١ جرام

كبريتات مغنسيوم ٠,٥ جرام

كربونات كالسيوم ٢ جرام

كلوريد صوديوم ٠,١ جرام

مـاء مقطر ١ لـتر

تخمر السكريات

ا – بيئة قاعدة المرق القرمزى

ببتون ١٠ جرام

مستخلص لحم ١ جرام

كلوريد صوديوم ٥ جرام

بروموكريزول الأرجوانى ٠,٠١٦ جرام

مـاء مقطر ١ لـتر

ب – بيئة تركيبية تحتوى على مصدر غيرعضوى للنيتروجين .

فوسفات أحادية الأمونيوم ١ جرام

obeikandl.com

كلوريد بوتاسيوم	٠,٢	جرام
كبريتات مغنسيوم	٠.٢	جرام
بروموثيمول الأزرق	٠.٠١٦	جرام
مـاء مقطر	١	لـتر

السترات

فوسفات صوديوم وأمونيوم	١,٥	جرام
فوسفات أحادية البوتاسيوم	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	٠.٢	جرام
سترات صوديوم	٣	جرام
مـاء مقطر	١	لـتر

جيلاتين مغذى

مستخلص لحم	٣	جرام
ببتون	٥	جرام
جيلاتين	١٥٠	جرام
مـاء مقطر	١	لـتر

(تعقم البيئة تعقيم متقطع)

ديبوز

نترات صوديوم	,٥	جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٥	جرام
كلوريد بوتاسيوم	,٥	جرام

obeikandl.com

كبريتات حديديك	,٠٠١ جرام
ماء مقطر	١ لتر

فوجس بروسكاور - أحمر الميثيل

ببتون	٧ جرام
فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٥ جرام
جلوكوز	٥ جرام
ماء مقطر	١ لتر

كليجلر

مستخلص لحم	٣ جرام
مستخلص خميرة	٣ جرام
ببتون	١٥ جرام
بروتيوزببتون	٥ جرام
لاكتوز	١٠ جرام
جلوكوز	١ جرام
كبريتات حديدوز	,٢ جرام
كلوريد صوديوم	٥ جرام
ثيوكبريتات صوديوم	,٣ جرام
آجار	١٥ جرام
أحمر فينول	٠,٠٢٤ جرام
ماء مقطر	١ لتر

لبن البروموكريزول الارجوانى

لبن فرز طازج	١٠٠ مل

بروموكريزول الأرجوانى	٠١٦, جرام

(تعقم البيئة تعقيم متقطع)

لبن عباد الشمس

يحضر باضافة كمية كافية من محلول مائى مشبع من عباد الشمس إلى لبن فرز طازج حتى يصبح اللون أزرق واضح (تعقم البيئة تعقيم متقطع) .

مرق التريبتون

تريبتون	١٠ جرام
مستخلص لحم	٣ جرام
ماء مقطر	١ لتر

مرق النترات

مستخلص لحم	٣	جرام
ببتون	٥	جرام
نترات بوتاسيوم	١	جرام
ماء مقطر	١	لتر

مرق اللاكتوز

مستخلص لحم	٣	جرام
ببتون	٥	جرام
لاكتوز	٥	جرام
بروموثيمول الأزرق	٠١٦,	جرام

obeikandi.com

مـاء مقطر	١	لتر

(تعقم البيئة تعقيم متقطع)

مرق اليوريا

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	١	جرام
كلوريد كالسيوم	,١	جرام
كبريتات مغنسيوم	,٣	جرام
كلوريد صوديوم	,١	جرام
كلوريد حديديك	,٠١	جرام
مستخلص لحم	٥	جرام
يوريا	٢٠	جرام
مـاء مقطر	١	لـتر

تذاب اليوريا فى ٥٠ مل ماء وتعقم على حدة بالترشيح ثم تضاف باقى مكونات البيئة بعد تعقيمها .

مرق ببتون أملاح الصفراء واللاكتوز ودليل الاخضر الزاهى

صفراء ثور (Bacto)	٣٠	جرام
لاكتوز	٥	جرام
ببتون	٢٠	حرام
ص كل	٥	جرام
أخضر زاهى ١٪	٢	مـل
ماء مقطر	١	لـتر

مرق خلاصة المولت

مستخلص المولت	٢٠	جرام
ماء مقطر	١	لتر

مرق دكستروز تريبتون بروموكريزول الارجوانى

تريبتون	١٠	جرام
دكستروز	٥	جرام
بروموكريزول أرجوانى	.٠٤	جرام
ماء مقطر	١	لتر

مرق مغذى

ببتون	٥	جرام
مستخلص لحم	٣	جرام
ماء مقطر	١	لتر .

ملحق ٢

الصبغات والمحاليل التى تستعمل فى طرق الصبغ المختلفة

ارثروسين

أرثروسين	١	جرام
محلول فينول ٥ ٪	١٠٠	مل
كلوريد كالسيوم	,٠٥	جرام

أزرق الميثيلين

أزرق الميثيلين	٠,٣	جرام

كحول ٩٥٪	٣٠	مـــل
مـاء مقطر	١٠٠	مـــل

أذب أزرق الميثيلين فى الكحول ثم أضف الماء المقطر ورشح المحلول خلال ورق ترشيح .

صبغة الأسواط

محلول أ

حمض تانيك	٤	جرام
كلوريد حديديك	١,٥	جرام
مـاء مقطر	١٠٠	مـــل

إخلط السابق ثم أضف إليه الآتى :

أيدروأكسيد صوديوم ١٪	١	مـــل
فورمالين ٤٠٪	٢	مـــل

يجب أن يكون الـpH النهائى للمحلول السابق ١,٥ ــ ١,٨

محلول ب

نترات فضة	٢	جرام
مـاء مقطر	١٠٠	مـــل

أذب نترات الفضة ثم احتفظ بـ١٠ مل . ثم أضف إلى الـ ٩٠ مل الباقية ايدروأكسيد الأمونيوم نقطة نقطة حتى يتكون راسب .

استمر فى إضافة ايدروأكسيد الأمونيوم نقطة نقطة حتى يزول الراسب ثم توقف عن الإضافة .

ثم أضف محلول نترات الفضة (١٠ مل المحتفظ بها) إلى المحلول الرئيسى

نقطة نقطة حتى تتكون عكارة خفيفة . أختبر pH والذى يجب أن يكون من ٩،٨ – ١٠ .

يجب إجراء الصبغ فى خلال ٤ ساعات من تحضير الصبغة .

صبغة الجراثيم

طريقة Schaeffer and Fulton المعدلة

محلول أخضر المالاكيت

أخضر المالاكيت	٥	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

محلول سفرانين

سفرانين	,٥	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مل

صبغة المقاومة للاحماض

طريقة Ziehl and Neelsen

كربول الفوكسين

محلول أ

فوكسين قاعدى	,٣	جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	١٠	مل

محلول ب

فينول	٥	جرام
ماء مقطر	٩٥	مل

obeikandl.com

ثم أخلط محلول أ إلى محلول ب تدريجيا مع التقليب . ثم يرشح المخلوط خلال ورقة ترشيح قبل الاستعمال .

كحول حامضي

كحول ايثايل ٩٥٪	٩٧	مـــل
حامض يدكل مركز	٣	مـــل

أزرق ميثيلين

مثل التحضير السابق .

صبغة جرام

طريقة Huc ker

صبغة الكريستال البنفسجية

محلول أ

كريستال بنفسجي	٤	جرام
كحول ايثايل ٩٥٪	٢٠	مـــل

محلول ب

أكسالات أمونيوم	٨	جرام
ماء مقطر	٨٠	مـــل

إخلط محلول أ ، ب بكميات متساوية . ويفضل تخفيف المحلول (ا) عشر مرات على أن يخلط ٢٠ مل من المحلول بكمية مساوية من المحلول (ب) .

محلول اليود

يود	١	جرام
يوديد بوتاسيوم	٢	جرام

obeikandl.com

ماء مقطر	٣٠٠	مـل

إصحن اليود ويوديد البوتاسيوم فى هاون ثم يذاب فى الماء .

يحفظ المحلول فى زجاجات ملونة .

الصبغة العكسية

سفرانين	٠٫٢٥	جرام
كحول ٩٥ ٪	١٠	مـل
مـاء مقطر	١٠٠	مـل

أذب السفرانين فى الكحول ثم اضف الماء ورشح .

صبغة الغلاف

طريقة Anthony

صبغة الكريستال البنفسجى

كريستال بنفسجى	١	جرام
مـاء مقطر	١٠٠	مـل

محلول كبريتات نحاس

كبريتات نحاس	٢٠	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

صبغة فونتانا

مثبت فونتانا

حمض خليك ثلجى	١	مـل
فورمالين	٢	مـل
مـاء مقطر	١٠٠	مـل

معمق فونتانا

حمض تانيك	٥	جرام

obeikandi.com

ماء مقطر	١٠٠	مـل

محلول فضة فونتانا

١ – يذاب ٥ جرام نترات فضة فى ١٠٠ مل ماء مقطر

٢ – خفف ٥ مل من محلول أمونيا مركزة بـ ٤٥ مل ماء مقطر :

٣ – خذ ٩٠ مل من محلول نترات الفضة وأضف إليه ٢٥ مل من محلول مخفف من الأمونيا .

٤ – استمر فى اضافة الأمونيا نقطة نقطة حتى يذوب الراسب المتكون.

٥ – أضف محلول نترات الفضة (١٠ مل المحتفظ بها) إلى المحلول الرئيسى نقطة نقطة حتى تتكون عكارة خفيفة .

نجروسين

نجروسين	١	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـل

ملحق ٣

المحاليل

احمر الميثيل

أحمر ميثيل	٠,١	جرام
كحول ايثايل ٩٥ ٪	٢٥٠	مـل
ماء مقطر	٢٥٠	مـل

أذب أحمر الميثيل فى الكحول ثم أضف الماء المقطر ورشح .

الفانفثايل امين

ألفانفثايل أمين	٥	جرام
حامض كبريتيك مركز	٨	مـل
ماء مقطر	١	لـتر

أضف حامض الكبريتيك إلى الماء المقطر ثم أضف الالفانفثايل أمين وقلب حتى يتم الذوبان .

باريت ا

الفانفثول	٦	جرام
كحول ايثايل ٩٥ ٪	١٠٠	مــل

باريت ب

ايدروأكسيد بوتاسيوم	١٦	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مــل

حمض بوريك ٢,٠ جزيئي

بللورات حمض بوريك	١٢,٤	جرام
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠	مــل

حمض ستريك ١, جزئي

حمض ستريك	٢١	جرام
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠	مــل

حمض سلفا نيليك

حمض سلفانيليك	٨	جرام
حمض كبريتيك مركز	٤٨	مــل
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠	مــل

أضف حمض الكبرتيك إلى ٥٠٠ مل ماء مقطر . ثم أضف حمض سلفانيليك ثم ماء مقطر ليصل الحجم إلى ١٠٠٠ مل .

فوسفات ثنائيةالبوتاسيوم ٢, جزيئي

فوسفات ثنائية البوتاسيوم	٣٤,٩	جرام
ماء مقطر حتى يصل الحجم إلى	١٠٠٠	مــل

كوفاك

بارا — داى ميثيل — أمينو — بنزالدهيد	٥	جرام
كحول اماايل أو بيوتايل	٧٥	مـــل
حمض يد كل مركز	٢٥	مـــل

أذب المادة الأولى فى الكحول ثم أضف الحمض بعد ذلك .

مزيج فاسبار

فازلين	١	جزء
شمع بارافين	١	جزء

سخن حتى تنصهر المادتين .

مزيج هضم البروتينات . .

حمض كبريتيك مركز	٥٠٠	مـــل
كبريتات صوديوم	٧٥	جرام
سلينايت النحاس	٢	جرام
ماء مقطر	٥٠٠	مـــل

منظم فوسفاتى

محلول أ

فوسفات أحادية البوتاسيوم	٠,٩٠٧٨	جرام
ماء مقطر	١٠٠	مـــل

محلول ب

فوسفات ثنائية الصوديوم	٠,٩٤٦٥	جرام
مـاء مقطر	١٠٠	مـــل

أخلط ١ ; ٦١ مل من المحلول ب مع ٣٨,٩ مل من المحلول ا (pH) = ٧).

نسلر

أذب ٦٢,٥جرام من يوديد البوتاسيوم فى ٢٥٠ ملماء مقطر احتفظ بـ ١٠ مل من هذا المحلول . أضف إلى الجزء الرئيسى من المحلول السابق بالتدريج محلول مشبع مبرد من كلوريد الزئبق مع التقليب المستمرحتى يتكون راسب دائم . أضف محلول يوديد البوتاسيوم (١٠ مل المحتفظ بها)و كميات أضافية من كلوريد الزئبق حتى يتكون راسب أحمر فاتح .

أذب ١٥٠ جرام من ايدرو أكسيد البوتاسيوم فى ١٥٠ مل ماء مقطر . برد المحلول ثم يضاف إلى المحلول السابق .

خفف إلى أن يصل الحجم إلى لتر بالماء المقطر . أترك المحلول لمدة أسبوع وخذ الرائق للاستعمال .

يود مركز

يود	١٥	جرام
يوديد بوتاسيوم	٧٥	جرام
ماء مقطر	٢٢٥	مــــل

اصحن اليودويوديد البوتاسيوم فى هاون ثم يذاب فى الماء . يحفظ المحلول فى زجاجات ملونة .

obeikandl.com

المراجع

أبو الذهب (مصطفى كمال) ١٩٦٥ – البكتريا – دار المعارف(٧٣٣صفحة)

سليم (محمود) ، طه (صلاح الدين) – ١٩٥٣ – البكتيريولوجيا العملية . الطبعة الثانية – مطبعة العلوم بالقاهرة (١٧٤ صفحة) .

شحاته (أحمد محمد التابعى) ، عبد الغفار (أحمد صبرى) ، أبو الذهب (مصطفى كمال)، الراكشى (سعد الدين) – ١٩٦٢ – الأساسيات العلمية فى علوم الأحياء الدقيقة . عام وتطبيقى – دار المعارف بمصر (٣١٠ صفحة) .

فكرى (محمد عزيز) – ١٩٦٩ – الميكروسكوب ، استعماله فى الفحص البيولوجى – الهيئة العامة للكتب والأجهزة العلمية (٢٤٧ صفحة).

Abo-El Dahab, M.K and M A El Goorani. 1969. Antagonism among strains of *Pseudomonas solanacearum*, Phytopath. 59 : 1005-1007

Baker, F.J. 1662. Handbook of Bacteriological Technique. Butterworths, London 369 p.

Blendon, D C. and H. S. Goldberg. 1965. Silver impregnation stain for *Leptospira* and flagella. J. Bact. 89 : 899-900.

Braun, W. 1953. Bacterial Genetics, W.B. Saunders Company. Philadelphia - London 288 p.

Clifton, C.E. 1958. Introduction to the Bacteria. McGraw-Hill Book Cpompany, Inc. New York, Toronto, London. 558 p.

Collins, C.H. and C.E.D. Taylor. 1969. Microbiological Methods. 2nd Ed. Butterworths, London. 404 p.

Cruickshank, R. 1960. Mackie & McCartneyls Handbook of Bacteriology

Tenth Edition. E & S. Livingston Limited Edinburgh and London 980 p.

De Vay. J E and W.C Schnathorst. 1963. Single cell isolation and preservation of bacterial cultures Nature 199 775-777

Dixon. M and E C Webe 1967 Enzymes 2nd Ed Longmans 950 p

EL.Helaly AF .M.K. Abo-El-Dahab and M A El-Goorani 1966 Nutritional requirements of isolates of *Erwinia amylovora* Phytopathology 56 815 - 849

——— ——— — — — 1969 Chromogenesis in cultures of *Pseudomonas solanacearum* J Phytopathology U.A.R ,1 1-11

Hunwicke. 1931. The Essentials of Bacteriological Technique. Williams and Norgate. LTD 108 p

Johansen D A 1940 Plant Microtechnique. Mc Graw Hill Book Company. New York and London. 523 p

Johnson L.F.,E.A.,Curl, S.H. Bond, and H.A. Fribourg, 1960. Methods for Studying Soil Microflora-Plant Disease Relationships. Burgess Publishing Company Minneapolis 15, Minn. 178 p.

Kelman.A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pesudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium. Phytopathology 44 : 693-695.

Kleiner: I.S. and J.M. Orten. 1962. Biochemistry. Sixth Ed. The C.V Mosby Company. St, Louis, 867 p

Lord,T.H. 1959. Determinative Bacteriology-Laboratory Manual Burgess Publishing Co, Minneapolis 15-Minn 84 p.

Mackie, T,S. and J.E. McCartney. 1945. Handbook of Practical Bacteriology. Seventh Ed. E. and S. Livingstone, L.T,D. Edinburgh. 720 p.

Pelczar, M.J. (J.R.,) P.A. Hansen, and W.A. Konetzka. 1955. Quantitative Bacterial Physiology, Laboratory Experiments. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15-Minn, 149 p.

Pelczar;M.J. : (JR.) and R.D.Reid. 1965. Microbiology. 2nd Ed, Mc Graw Hill Book Company New York. 662-p.

Sarles,W.B., W.C. Frazier, J.B, Wilson, and S.G Knight. 1956. Microbiology, General and Applied. Second Edition. Haper and Brothers, New York. 491 p.

Salle, A.J, 1948. Fundamental Priniciples of Bacteriology. Third Edition, Mc Graw-Hill Book Company. New York-Toronto- London 730 p.

Salle, A.J. 1948. Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology. Third Edition Mc Graw-Hill Book Company. New York-Toronto-London 176. p,

Schoenhard,D.E. 1962. Basic Conceptes and Experiments in Microbiology Burgess Publishing Co, Minnesota. 246 p.

Slack, J.M., J.E. Dyson, and W.K. Harrell. 1960. Experimental Pathogenic Microbiology. Burgess Publishing Company., Minneapolis 15, Minn. 146 p.

Society of The American Bactriologists. Committee on Bacteriological Technique. 1946. Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria. Geneva, N.Y. Loose Leaf.

Stanier, R.Y., M. Doudoroff and E.A. Adelberg. 1972. General Microbiology. Third edition. The Macmillan, London,N.Y.873.

Sykes, G. 1958. Disinfection and Sterilization. E. and F. N. Spon. Ltd London. 393. p.

Thimann, K.V.1961 The Life of Bacteria. The Macmillan Company, New York. 775 p.

United States Department of Agricultuie. 1965 Proceedings of the Fisist Workshop on Phytobacteriology. University of Missouri. Columbia, Missouri. 91. p.

Waksman, S.A. 1950. The Actinomy cetes. Waltham, MASS, U.S.A. Published by the Cıonica Botanica Company. 230 p.

Wedberg S. E. 1966. Introduction to Microbiology. Reinhold Publishing Corporation, New York. 426. p.

Wilson, G.S. and A.A. Miles. 1964. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. V.olume I. Fifth Edition, Edward Arnold (Publishers) LTD. London, 1191 p.

obeikandl.com

طبع بمطابع جريدة السفير
١٤ شارع الصحافة
ت ٨٠٣٩٦٤ إسكندرية

obeikandl.com