كلية الزراعة – جامعة واسط

المرحلة الثانية

الاحياء المجهرية العملي

المختبر الاول   م. نور كاظم كريم الزبيدي

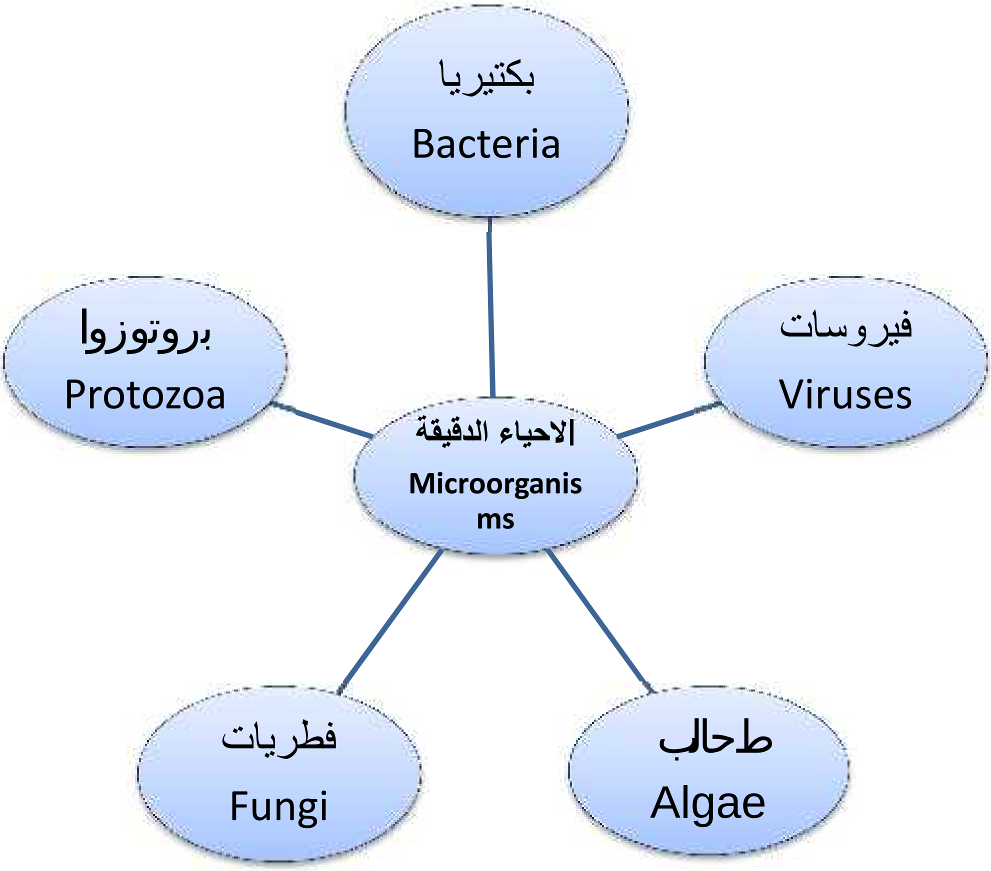
مختبر الأحياء المجهرية **Laboratory of microbiology**

علم الأحياء المجهرية microbiology :- هو **العلم الذي** يختص بدراسة الكائنات الحية الدقيقة **التي لا** ترى بالعين المجردة ، **وقد اشتقت** التسمية من اللغة اللاتينية **فكلمة Micro تعني** دقيقة الحجم **وكلمة Biology** تعني علم الأحياء.

وهذا العلم يهتم بدراسة الأحياء الدقيقة **microbiology** فى خطين مكملين لبعضهما البعض.

1. الخط الاول :- دراسة الكائنات الحية الدقيقة من حيث أنواعها وإشكالها وتركيبها ووظائفها وفروعها **التي تشمل** Bacteriology, Mycology, Pychology, Virology, Protozology.

2. الخط االثانى :- يختص بدراسة نشاط الكائنات الدقيقة فى بيئاتها ودورها فى التغيرات التى تحدث فى الطبيعة (الجانب التطبيقى لنشاط استخدام لكائنات الدقيقة) ويشمل Soil microbiology , Air microbiology, Food microbiology, industrial microbiology, water microbiology



تعليمات الأمان والسلامة فى مختبرات الكائنات الحية الدقيقة Microorganisms

1. الألتزام بأرتداء الصدرية قبل الدخول للمختبر.

2. قراءة التعليمات الخاصة بكل تجربة بدقة قبل البدء في العمل والتأكد تماماً من معرفة طريقة العمل procedure.

3. لبس قفازات (gloves) خاصة باليدين لضمان عدم انتقال أي كائن حي دقيق ممرض أو التصاقة بجسم الانسان ثم التخلص منها بعد العمل.

4. عدم نقل او حمل العينات أو المزارع الميكروبية (المزارع البكتيرية او الفطرية) خارج المختبر، ويجب التعامل معها على أنها عينات معدية (infectious samples).

5. التأكيد على وجوب التعامل مع اللهب بحرص بالغ والانتباه لخطورة احتراق أكمام الملابس أو القفازات المطاطية وعدم الاقتراب منه مباشرتآ بعد تعقيم اليدين بالكحول ويجب الحرص على إطفاءه بعد الانتهاء من العمل.

6. المجهر Microscope يعتبر الصديق المصاحب لطالب علم الأحياء الدقيقة فيجب صيانته والتعامل معه بدقة، ويجب تنظيف العدسات وعدم ترك الشريحة على المجهر وغلق المجهر بعد الانتهاء من الفحص.

7. يجب وضع كافة أدوات المختبر المستخدمة في أماكنها المخصصة من أطباق بتري وأنابيب وشرائح والعينات والمزارع الملقحة حتى يتم تعقيمها والتخلص منها بالطرق الصحيحة المناسبة.

8. يجب ملاحظة ان النظافة والدقة في العمل مهمان جداً في جميع التجارب لان التعامل سوف يكون مع كائنات حية دقيقة ممرضة (pathogenic) كما ان التلوث قد يحدث بسرعة ومن اقل الاسباب لذلك يجب الاهتمام بجميع المواد المستعملة في المختبر.

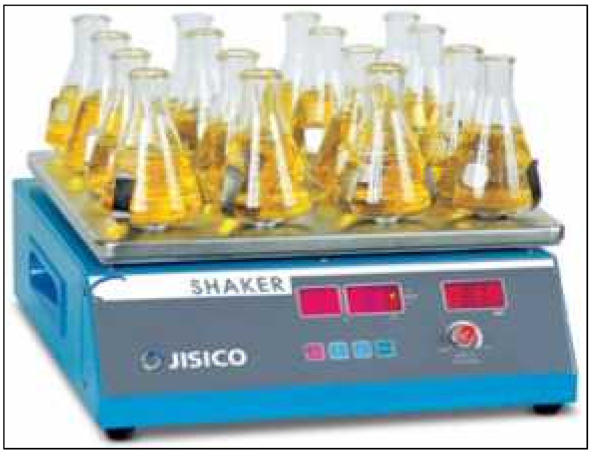
9. يجب كتابة تقرير Report لكل تجربة يتضمن النقاط التالية: عنوان التجربة - الهدف من التجربة- طريقة العمل- النتائج تذكر كما هي وإن كانت سلبية - المناقشة (يتضمنها رأيك واقتراحاتك بعد بحثك الخاص) - مع الرسوم التوضيحية والصور.

الأجهزة ولأدوات المستخدمة في مختبر الاحياء المجهرية

1- المجاهر المركبة Compound microscopes:- وهي على نوعين مجهرضوئي light microscope وهو ابسط انواع المجاهر التكبير صورة الاحياء المجهرية (كالبكتريا Bacteria) **او** الاشياء المراد فحصها عدة مرات لتسهيل دراستها ولا**يخلو اي مختبر من** مختبرات الاحياء المجهرية من **هذا** النوع من المجاهر وذلك لانه **بمثابة** عين المايكرو بايلوجي التي يرى بها الاحياء المجهرية اما النوع الثاني هو المجهر الالكتروني electronic microscope يستخدم في الفحوصات المتقدمة للأحياء المجهرية (كالفايروسات Viruses) .

2- **الحاضنات Incubators.** تستخدم الحضن الاحياء المجهرية وتنظم درجة حرارتها حسب درجة **الحرارة المثلى** optimum temperature للاحياء قيد التنمية والتي تتراوح بين (20 - 40)**م**^{O} وهي درجة الحرارة المثلى لجميع الاحياء تقريبآ فدرجة حرارةالبكتريا (37)**م**^{O} **لمدة** (24 – 48) ساعة اما **الاعفان**(20 – 25)**م**^{O} **لمدة** (3 - 5) ايام .

3- الحمام المائي Water bath. وهو على نوعين حمام مائي عادي water bath وهوعبارة عن جهاز يحتوي على ماء وهيتر ومحرار يقوم بواسطة الحرارة الرطبة بتسخين الماء حيث يستخدم لأذابة الأوساط الزرعية الصلبة ، وكذلك يمكن بواسطة يتم عزل البكتريا المكونة للسبورات في درجة حرارة (80)م^{O} حيث يقتل الأحياء المجهرية وتبقى السبورات الأنها مقاومة لدرجة حرارة (121)م^{O} اما النوع الثاني هو حمام مائي هزاز Shaker water bath يستخدم في فحوصات الأحياء المجهرية للتربة (Soil microorganisms).



4- الموصدة (جهاز التعقيم البخاري) Autoclave. يستخدم لتعقيم الاوساط الغذائية المستخدمة لتنمية الاحياء المجهرية وكذلك السوائل المتحملة الحرارة العالية بدرجة (121)م^{O} لمدة 15 دقيقة كما يستخدم لاتلاف المزارع التي انتهت الحاجة منها .

5- الفرن الجاف Dry oven. يستخدم لتعقيم الزجاجيات بمختلف انواعها وينظم على درجة حرارة (170-180)م^{O} لمدة (3-4)ساعات .

6- عداد المستعمرات Colony counter. يستخدم في عد المستعمرات البكتريا النامية على الاوساط الزرعية في الاطباق ويحتوي على مؤشر عند الوصول الى المستعمرة يقوم بجمع الاعداد .

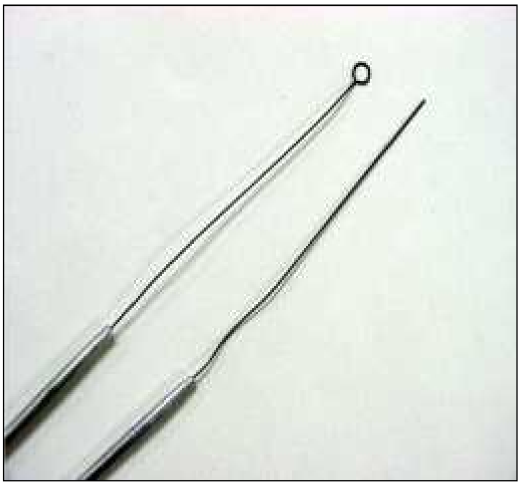
7- ثلاجة Refrigerator. تستخدم لحفظ المواد الكيميائية والاوساط الزرعية وبعض الانواع الميكروبية المهمة.

8- ميزان كهربائي Electrical balance. يستخدم في وزن المواد الكيميائية المكونة الاوساط الزرعية.

9- الاطباق الزرعية Culture dishes. وهي على نوعين اطباق بيتري زجاجية glass petrey dish يمكن غسله واعادة تعقيمه بواسطه الفرن الجاف واستخدامه لزرع الاحياء المجهرية **اما النوع الثاني لطبلق** بيتري بلاستيكية disposable petrey dish الذي يستعمل لمره واحده كلاهما يستخدم في زرع الاحياء المجهرية حيث يتم فيها وضع الاحياء المجهرية مع الوسط الزرعي ثم توضع في الحاضنة .

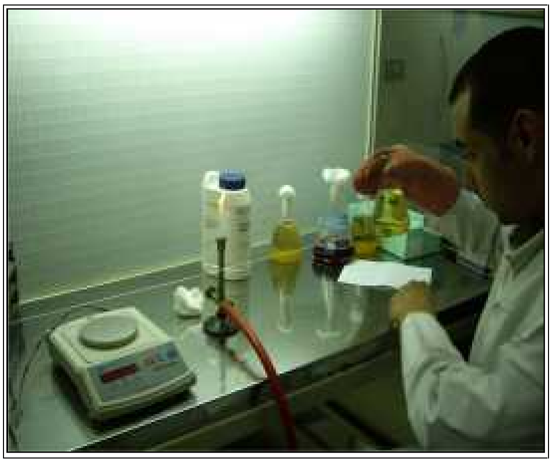
10- قناني التخفيف Dilution bottles. وهي قناني بلاستيكية تستخدم لتخفيف العينات لكي نحصل على احياء مجهرية اقل عدد من التي لم تخفف ثم يتم تنميتها في الوسط الزرعي حيث نحصل على (200 3000) كائن مجهري في العينة المخففة بيمنا في العينة الغير المخففة نحصل على (10 ملايين) كائن مجهري.

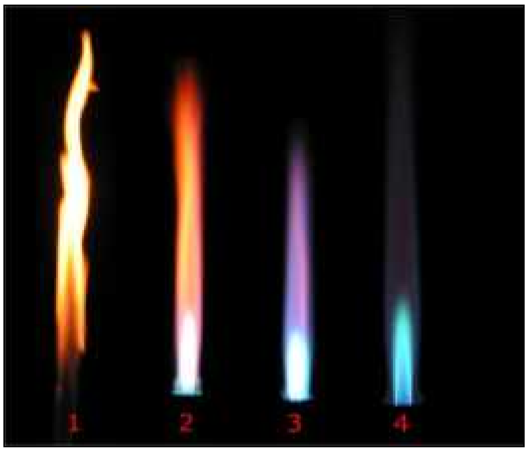
11 - ابرة التلقيح Loop & Needle. تستخدم في نقل وتخطيط الاحياء المجهرية عند زرعها داخل الأوساط الزرعية.



12- شرائح الزجاجية وأغطية الشرائح glass Slid & Cover Slid. تستخدم لتحضير وفحص عينات الاحياء المجهرية تحت المجهر.

13- مصباح بنزين Bunsen burner :- يستخدم في تعقيم اثناء عملية زرع الأحياء المجهرية في المختبر.





14- أنابيب الأختبار Test tube. **تستخدم لزرع** الأحياء الدقيقة (بكتريا المياة) وكذلك لحفظ المزارع البكتريا بشكل مائل.

15- انابيب درهم Durhum tube . تستخدم لتنمية البكتريا المنتجة للغاز والحامض .

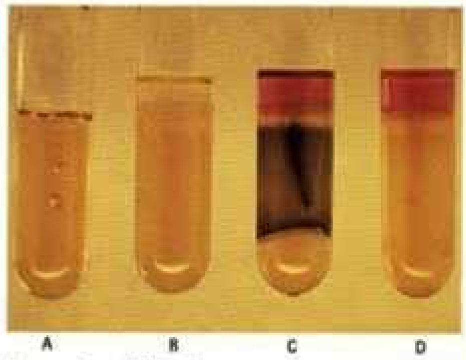


Figure Bacto-SIM reactions.

III.2 Reactions in fermentation tubes. 1 is an uninoculated control. Growth and acid production from carbohydrate fermentation are seen in **2.** Acid and gas are produced from fermentation in **3** (Exercise 14).

كيفية استخدام الميكروسكوب فى دراسة البكتيريا

يتكون المجهر الضوئي light microscope من نوعين من العدسات : العدسة الشيئية Objective lens والعدسة العينية Ocular lens ويستخدم أشعة الضوء المرئى كمصدر لإضائة الجسم المفحوص وعند تحريك قصبة الميكروسكوب فى إتجاه المسرح المثبت به العينة تكون العدسات الشيئية قريبة من العينية، وباستعمال المنظم الكبير (Coarse adjustment) وهو مسمار فى جانب الميكروسكوب يوضح العينة المراد فحصها ولكن بدرجة قليلة، وكذلك بإستعمال المنظم الدقيق (Fine adjustment) وهو مسمار أخر يمكن عند إستعماله من أن يظهر العينة بدرجة واضحة جداً وهنا يمكن من الحصول على صورة واضحة للغاية.

ويستعمل المنظم الكبير عند استعمال العدسة الشيئية x5 أما المنظم الدقيق فيستعمل عند إستعمال العدسة الشيئية قوة x10 او x 40 أو العدسة الزيتية قوة x .100.

وتسمى المساحة التى يمكن مشاهدتها من خلال الفحص بالميكروسكوب والتى تظهر فيها العينة بالحقل الميكروسكوبى ، ويعتمد فى الميكروسكوب على قوة العدسات المستعملة فى الفحص فقوة التكبير الكلى للعينة تساوى حاصل ضرب قوة العدسة الشيئية فى قوة العدسة العينية ، فإذا كانت العدسة الشيئية المستعملة فى فحص الخلايا البكتيرية هى العدسة الزيتية x100، وأستعملت العدسة العينية X 10 فيكون التكبير الكلى فى هذه الحالة هو: 1500= X 10 100مرة تكبيرة وهكذا فى بقية العدسات.

ولفحص العينات البكتيرية يستخدم عادتاً العدسة الزيتية التى توضع نقطة من نوع خاص من الزيت مثل زيت السيدر أو زيت البرافين النقى فوق العينة، وقبل أستخدام هذه العدسة الزيتية يتم تحديد موضع العينة بإستعمال العدسة الصغيرة X 10ثم تحرك العدسة الزيتية حتى تنغمس فى الزيت ، وفى وجود الزيت فإن الأشعة تنفذ من الزجاج الى الزيت ثم الى فتحة العدسة دون أن تنكسر لان معامل الزيت يساوى معامل إنكسار الزجاج وبهذا يمكن رؤية العينة البكتيرية بوضوح.

كيفية المحافظة على الميكروسكوب فى المختبر

1. عند حمل الميكروسكوب ضع أحد يديك تحت قاعدة الميكروسكوب واليد الأخرى على ذراع الميكروسكوب ولا تضعه بشكل مائل.
2. عند فحص العينة لا بد أن تكون عيناك الأثنتين مفتوحتين ولا تفحص بعين واحدة وتغلق العين الأخرى.
3. عند توضيح العينة حرك العدسات والمنظم الكبير والمنظم الصغير ببطء وبحرص حتى لا تنكسر العدسات أو تتخدش.

4. قبل أن تستخدم العدسة الزيتية وضح مكان العينة بإستعمال العدسة الصغرى 5 X أو 10 X ثم بالعدسة الجافة الكبيرة 40 X وأخيراً بالعدسة الزيتية.
5. حافظ على أن يكون مسرح الميكروسكوب نظيفاً وخالياً من الزيت والأوساخ.
6. يجب أن تكون العدسات نظيفة ، ويمكن أستعمال ورق خاص لتنظيفها ولا تلمس العدسات بيدك.
7. بعد الإنتهاء من فحص العينة، أنقل الشرائح وضعها فى العلب المخصصة لها ونظف الميكروسكوب من الزيت ثم غطه بغطائه الخاص به وضعه فى مكانه.

كلية الزراعة - جامعة واسط
المرحلة الثانية
الاحياء المجهرية العملي
المختبر الثاني م. نور كاظم كريم الزبيدي

التعقيم والتطهير Sterilization and Disinfectio

المقدمة Introduction

نلجأ عادة إلى السيطرة على الميكروبات إما لمنع انتقال العدوى أو منع التلوث أو لمنع الفساد الغذائي، وللسيطرة على الميكروبات يلاحظ أنه ليس من الضروري قتل جميع الميكروبات الموجودة، بل يُلجأ أحيانا إلى وقف نموها ونشاطها أو إزالتها من الجسم او الوسط المراد تعقيمه، وتستخدم العديد من الوسائل والمواد التي لها مدى معين للسيطرة على الميكروبات ومن هذا الوسائل، التعقيم **Sterilization** هو القضاء على جميع أشكال الحياة الميكروبية على الجسم أو الوسط المراد تعقيمه سواء كان ذلك الوسط بيئة غذائية أو محاليل مختلفة ، بما فيها تدمير الجراثيم الداخلية حيث إنها أكثر أشكال الحياة الميكروبية مقاومة. بينما التطهير **Disinfection** هو القضاء على الخلايا الخضرية الممرضة دون الجراثيم الداخلية أو الفيروسات، وتكون المادة المطهرة عادة مادة كيميائية تضاف إلى الجسم المراد تطهيره، مما يؤدى إلي تقليل عدد الميكروبات أو تثبط نموها ولا يؤدى التطهير إلى التعقيم الكامل

الأهداف Objectives

1. معرفة الطرق المختلفة لتعقيم المواد فى المختبر.
2. إدراك أهمية التعقيم لحياة الإنسان.
3. التفريق بين الطرق المختلفة للتعقيم الفيزيائية والكيميائية والميكانيكية.

الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة Tools and materials for the experiment

1.أبرة تلقيح	Loop
2.مصباح بنزن	Burner
3.فرن حرارى كهربائى	Dry oven
4. جهاز التعقيم البخاري	Autoclave
5. كحول أثيلى	Ethanol
6. ديتول	Detool
7. فينول	Phenol
8. مرشح بكتيرى	Millipore Filter

خطوات العمل Procedure

أولاً: الطرق الفيزيائية للتعقيم Physical methods of sterilization.

1- التعقيم بالحرارة Sterilization by Heat .

من المعروف ان لكل كائن حي ثلاث درجات حرارة بالنسبة لنموه هي

أ. درجة الحرارة المثلى للنمو **Optimum growth temperature** وهي انسب درجة حرارة لنمو الكائن الحي .

ب. درجة الحرارة الدنيا للنمو **Minimum growth temperature** وهي اوطأ درجة حرارة يمكن للكائن الحي ان ينمو عندها.

جـ. درجة الحرارة القصوى للنمو **Maximum growth temperature** وهي اعلى درجة حرارة يمكن ان يحدث عندها نمو الكائن الحي .

والتعقيم بالحرارة هو أكثر المعاملات القاتلة المستخدمة للتعقيم حيث يمكن تعقيم المواد والأشياء بطريقتين هما.

أ. التعقيم بالحرارة الجافة Dry Heat . وهى طريقة تتطلب وقت أطول ودرجة حرارة أعلى من الحرارة الرطبة . ومن طرق التعقيم بالحرارة الجافة:

1. أفران الهواء الساخن Oven. وتصل درجة الحرارة فى هذه الأجهزة بين 160 - 180 درجة مئويه وهى تصلح لتعقيم الأدوات الزجاجية مثل أنابيب الأختبار والماصات والدوارق الزجازية الفارغة وأطباق بترى ويكفى لتعقيمها من 4 الى 5ساعات عند 180 مْ.

2. أللهب المباشر لدرجة الإحتراق Flame. عادة يستخدم اللهب المباشر من مصباح بنزن فى تعقيم إبر التلقيح والحقن المستقيمة أو ذات العقدة وعادة تصنع هذه الأبر من أسلاك رفيعة من البلاتين أو خيط من النيكل والكروم.

3. التلهيب الكحولى Alcohol flame. يمكن تعقيم بعض الأدوات كالملقط و المقص وذلك بغمر الجسم المراد تعقيمية في كحول إيثانول ثم يعرض للهب المباشر فيشتعل ما يعلق به من الكحول ويعمل على قتل الكائنات الحية الدقيقة التي تكون عالقة به

ب. التعقيم بالحرارة الرطبة Moist Heat. وهى طريقة يقصد بها أستغلال بخار الماء فى إجراء التعقيم بدلا من الهواء الساخن وعادة تكون الحرارة الرطبة أكثر كفاءة فى قتل لخلايا البكتيرية من الحرارة المباشرة وذلك لأنها أكثر قدرة على التغلغل داخل الخلايا كما أنها ذات قدرة أسرع على تخثر البروتين الخلوى ومن أهم الأجهزة التى تستخدم الحرارة الرطبة فى التعقيم:

1- التعقيم بالمعاملات الحرارية المتقطعة (معقم أرنولد) Arnold Sterilizer.

معقم أرنولد عبارة عن وعاء معدنى بطبقة عازلة للحرارة ذو أرفف مثقوبة لتسهيل تسرب البخار الى كل أجزاء الجهاز وله فتحة فى قمته يوضع بها ثرموميتر لقياس درجة الحرارة بداخل الجهاز أثناء التعقيم ، ويجب التأكد قبل تشغيل الجهاز من إحتوائه على الماء الى الإرتفاع المناسب فى الخزان الخاص بذلك. وتوضع المواد المراد تعقيمها في جهاز ارنولد بدرجة حرارة 100 مْ لمدة نصف ساعة ولثلاثة ايام متوالية والغاية من ذلك هو في اليوم الاول تقتل الخلايا الخضرية وفي نفس اليوم خلال فترة الحضن تنبت السبورات المقاومة للحرارة وتكون خلايا خضرية وهذه تقتل في اليوم الثاني وهذه الطريقة تستخدم فى تعقيم البيئات (الأوساط) والمحاليل لتي لاتتحمل درجات حرارة اعلى من 100 مْ مثل بيئات الجلاتين.

2- التعقيم بإستعمال البخار تحت ضغط (جهاز التعقيم البخاري) Autoclave .

يستعمل بخار الماء أيضاً فى جهاز Autoclave إلا أن زيادة الضغط بداخل الجهاز تزيد من درجة حرارة التعقيم، وجهاز Autoclave فى أبسط صورة عبارة عن إسطوانة معدنية تتحمل الضغط له غطاء يقفل بإحكام بعد أن يوضع به المواد المراد تعقيمها وبعد التأكد من إحتواء الجهاز على الماء الى الإرتفاع المناسب ويتم توصيل الجهاز بمصدر كهرباء ليتم تسخين الماء الى درجة حرارة 121^{o}م لمدة 15 دقيقة وضغط جوى 15 رطل لكل بوصة مربعة (1 كجم لكل سم2) . وبعد التعقيم يتم التخلص من البخار بطريقة تدريجية حتى لا ينفجر الغطاء فى وجه المستخدم ثم يتم فتح الغطاء كاملاً. ويستعمل Autoclave فى تعقيم كثير من البيئات الغذائية السائلة أو المضاف إليها الأجار أو المحاليل السكرية والأملاح وكذلك المزارع القديمة المراد التخلص منها.

2- التعقيم بالإشعاعات Radiation Sterilization.

تتكون اشعة الشمس من اشعاعات ذات اطوال موجية مختلفة هي الاشعة المرئية والاشعة تحت الحمراء والاشعة فوق البنفسجية والاخيرة لها تأثير فعال في القضاء على بعض الاحياء الدقيقة ويعزى مفعولها الى انها تعمل حالة اضطراب في الخلية حيث تؤثر على البروتوبلازم،وتستخدم مصابيح الاشعة فوق البنفسجية لتعقيم هواء غرف العمليات وهواء غرف عزل وتنقية الاحياء المجهرية.

ثانياً: الطرق الكيميائية للتعقيم Chemical methods of Sterilization.

تقسم المواد الكيميائية ذات التأثير القاتل للأحياء الدقيقة الى:

أ. **Bacteriocidal** وهي المركبات الكيميائية التي تقتل الميكروبات سريعا أي تقتل البروتوبلازم .

ب. **Bacteriostatic** وهي المركبات الكيميائية التي يتم فيها تثبيط النمو البكتيري وإيقاف التكاثر مع عدم قتل البكتريا.

ج . **Disinfections** وهي مواد مطهرة تستخدم لتطهير الأشياء وتسمى المطهرات السطحية وهى قاتلة للأحياء الدقيقة وذات تأثير ضار بالجلد والأغشية المخاطية.

وفيما يلى بعض المواد الكيميائية التى تستعمل فى صورة محاليل لتعقيم السطحى للمواد التى لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية:

1. **الكحول الأيثيلى Ethyl alcohol.** يستعمل عادةً بتركيز يتراوح بين 50-70% فى تطهير الأيدى والمناطق المختلفة فى جسم الإنسان والسبب الأساسى للتأثير السام هو التجفيف علاوة على قدرته عى إذابة الدهون وترسيب البروتين (تخثر البروتين) .

2. **الفينول Phenol.** يستعمل بتركيزات تتراوح بين 2-5% للتعقيم السطحى لأرضيات الغرف والعيادات والمعامل وأسطح المناضد التى تجرى عليها عمليات العزل وتنمية المزارع للكائنات الدقيقة وهو يعمل على تخثر البروتينات ويحدث خلل فى الغشاء الخلوى.

3. **كلوريد الزئبق Mercuric chloride ($HgCl_2$).** يستعمل محلول كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% فى أغراض التعقيم السطحى كتعقيم سطح مناضد المعامل ، كما يستعمل لتعقيم السطحى للبذور والأجزاء النباتية المصابة بأمراض نباتية ويرجع الفعل السام الى إرتباط أيونات الزئبق بمجاميع السلفوريل (SH) فى البروتين.

4. **الفورمالين والديتول Formaline and Detole.** وهى المطهرات المستخدمة بتركيز تتراوح بين 2-5% فى تعقيم أسطح الأماكن التى يتم عليها العزل والتنمية المزارع للكائنات الدقيقة وهو يرتبط **بمجموعات** NH_2 ، COOH، SH .

ثالثاً: الطرق الميكانيكية Mechanical methods of sterilization.

وتعتمد هذه الطرق على إزالة الأحياء الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه بالترشيح خلال مرشحات ذات ثقوب لا تسمح بمرور خلايا الكائنات الحية الدقيقة ، وتستخدم هذه الطريقة أيضاً لتعقيم المواد الحساسة للمعاملات الحرارية المرتفعة مثل الفيتامينات والأنزيمات.

والمرشحات التى تستخدم للفصل البكتيريا من السوائل تسمى المرشحات البكتيرية **Bacterial Filters** نسبة لصغر حجم ثقوبها (أقل من 1 ميكرون) حيث تعمل على حجز الخلايا البكتيرية على أسطحها عند إمرار محلول يحتوى على بكتيريا. وعادة يسحب السائل خلال المرشح وذلك بأحداث ضغط سالب بإستخدام مضخة تفريغ كهربائية أو مائية.

كلية الزراعة – جامعة واسط

المرحلة الثانية

الاحياء المجهرية العملي

المختبر الثالث م. نور كاظم كريم الزبيدي

.

البيئات والأوساط الغذائية Culture Media

المقدمة Introduction.

أن غالبية البحوث البكتريولوجية تتطلب إستعمال بيئات زرع مختلفة تحضر في المختبر، وتعرف البيئة الغذائية **(culture medium)** بأنها المادة أو مجموعة المواد التي يمكن أن تنمو عليها الكائنات الحية المجهرية أو هى عبارة عن البيئة التي تستعمل لزراعة وتنمية الكائنات الحية المجهرية المختلفة في المختبر وتحتوي عادة على جميع المكونات الضرورية للنمو، حيث تعتمد غالبية الدراسات والبحوث الميكروبية على استعمال بيئات غذائية مختلفة ، وهذه البيئات إن لم تكن متماثلة تماما مع البيئات التي تعيش فيها أو عليها هذه الكائنات في الطبيعة فيجب أن تكون قريبة الشبه منها من حيث توفير الاحتياجات والمتطلبات الغذائية اللازمة لتنميتها.

الشروط الواجب توفرها فى الوسط الغذائى Conditions of culture media.

1- توفر مصدر للكربون مثل السكروز والكلوكوز.
2- توفر مصدر للنيتروجين العضوي كالأحماض العضوية واللاعضوية مثل أملاح الامونيا والنترات.
3- توفر كميات مناسبة من الكالسيوم والكبريت والفسفور
4- توفر ايونات لاعضوية أو معدنية بتراكيز قليلة مثل المنجنيز والحديد والخارصين.
5- توفرمصدر للرطوبة.
6- تعديل درجة حموضة pH البيئة حيث تعيش الفطريات في وسط حامضي قريب من التعادل (pH 6-7) والبكتريا في وسط قاعدي (pH 7-8).

الغرض من استخدام الأوساط الغذائية The purpose of culture media.

1- تنمية وحفظ النوع البكتيري.

2- دراسة تاثير الكائنات الدقيقة على احد المواد الغذائية الموجودة بالوسط.

3- تحفيز البكتيريا على انتاج او تكوين بعض المواد.

4- تصنيف البكتيريا ودراسة صفاتها المظهرية.

الأهداف Objectives

1. التعرف على أنواع الأوساط الغذائية المستخدمة فى عزل البكتيريا ودراستها مختبرياً.
2. التفريق بين الأوساط الغذائية المعقدة التركيب الكيميائى و الأوساط المعروفة التركيب.
3. تحضير بعض الأوساط الغذائية البسيطة والمعقدة التركيب الكيميائى المستخدمة فى عزل البكتيريا.

الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة Tools and materials for the experiment

1.جهاز الأتوكلاف	Autoclave
2. ميزان حساس.	Sensitive balance
3. دوارق مخروطية	Conical flask 250 or 500 ml
4. محرك زجاجي	Stirrer
5.ثلاجة	Refrigerator
6.اسطوانة مدرجة	Cylinder 100 or 200 ml
7. ملعقة كيميائية	Spatula
8.قطن طبي	Medical cotton
9.اوراق وزن	Weight paper
10.اكار	Agar
11.اكار مغذي	Nutrient agar
12.ماء مقطر	Distal water

خطوات العمل Procedure

أولا:- تقسيم الأوساط الزرعية على أساس مكوناتها أو التركيب الكيميائي إلى :-

1- الأوساط الطبيعية Natural media

يكون المصدر الغذائي بها أجزاء نباتية أو حيوانيـة أو كلاهما ، لذلك يطلق عليها بيئات غير محددة التركيب الكيمـاوي لأن التركيب الكيماوي الدقيق للأجزاء النباتية أوالحيوانية غير محـدد ويختلف باختلاف المـادة الطبيعية المستعملة، ويتم تجهيز هذه الأوساط بعدة طرق ، فقد تكون علـى شكل قطع من النسيج المهروس مثل قطع البطاطس و الموز ، أو قد تكون في صورة مستخلص حيث يتم

غلي وزن معين من النسيج النباتي أو الحيواني ثم يستخلص الرائق بواسطة قطعة من قماش الموسلين كما في مستخلص البطاطس والجزر والفاصوليا، ومن أهم الأوساط الطبيعية المستخدمة في المختبر .

ا – وسط دقيق الذرة Corn meal

ب- وسط أكار عصير ثمان خضروات Vegetables - 8 agar

2- الأوساط التركيبية أو الصناعية: Synthetic media

هذه تعرف أحيانا باسم الأوساط محددة التركيب الكيماوي ، حيث أنها تتكون من مخلوط من مركبات عضوية وأملاح غير عضوية أو أحدهما وتضاف بنسبة معينة وتذاب في الماء ، وبالتالي فإن التركيب الكيماوي لهذه البيئات معروف ومحدد، ومن أهم هذه الأوساط

أ - وسط دوكس اكار Dox agar media

ب - وسط براون Browne media

جـ - وسط الأكار المائي Plain agar media

3-الأوساط الطبيعية التركيبية (شبة صناعية) Natural synthetic media .

وهي عبارة عن اوساط تحتوي على مكونات طبيعية مضاف إليها بعض المواد الكيماوية المعروفة التركيب ويطلق عليها بيئات غير محددة التركيب الكيماوي ، ومن هذه الأوساط

أ- وسط مستخلص البطاطس والدكستروز " Potato Dextrose Agar " P. D.A

ب- وسط المرق المغذى Nutrient broth

جـ- وسط الأجار المغذي Nutrient agar

ثانيا:- تقسيم الأوساط الزرعية على أساس قوامها إلى-:

1- الأوساط الصلبة Solid media -: تتميز هذه الاوساط بكون قوامها صلب تحتوي على مادة **الأكار بنسبة** (1.5 – 2.5 غم) وهي المادة المسببة لصلابة الاوساط مثل وسط Nutrient agar وMaCconky agar

2- الاوساط شبة الصلبة Semi-Solid media -: تتميز هذه الاوساط بصلابة اقل من التي قبلها وذلك لاحتوائها على نسبة اقل من مادة الأكار (0.5 - 1.0 **غم) مثل وسط** mofility media

3- الاوساط السائلة Liquid media -: تكون هذه الاوساط بشكل سائل وهي لاتحتوي مطلقآ على **مادة الأكار ودائمآ** تنتهي تسمية هذة الاوساط بكلمة broth **مثل وسط** Nutrient broth و MaCconky broth

ثالثآ:- تقسيم الأوساط الزرعية على أساس وظيفتها وتطبيقاتها العملية إلى ما يلي-:

1- أوساط العزل (الأعتيادية) Isolation Media . وهي عبارة عن وسط غذائى بسيط يحتوي على جميع المكونات الضرورية للنمو مثل وسط الأ**كار المغذي** Nutrient agar .

2- لأوساط الاغنائية Enriched Media . وتحضر بإضافة مواد غذائية كالدم أو المصل أو مستخلص أنسجة نباتية أو حيوانية إلى الوسط الغذائى البسيط بحيث إن الوسط الناتج يدعم نمو البكتريا الحساسة، ، ومن هذه **الأوسط وسط** Blood agar

3- الأوساط الانتخابية او الانتقائية Selective Media . تحضر بإضافة مواد كيميائية معينة إلى الوسط الغذائي البسيط لمنع نمو مجموعة معينة من البكتريا من غير أن تثبط الأنواع الأخرى ، **ومن** هذه الأوساط

أ- **وسط** Potato Dextrose Aagar (PDA) أنتقائي لتنمية الفطريات و الخمائر فقط .

ب- **وسط** Hektoen enteric agar أنتقائي للبكتريا السالبة لصبغة كرام .

جـ- **وسط** mannitol salt agar أنتقائي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام.

4-الأوساط التفريقية Differential media. وتحضر بإضافة بعض العوامل والمواد الكيميائية إلى الوسط الغذائى البسيط لإنتاج تغييرات معينة في النمو والتي يمكن بواسطتها التمييز بين الأنواع المختلفة من البكتريا ، ومن هذه الأوساط

أ- **وسط** MacConke للتفريق بين البكتريا المخمرة للاكتوز والغير مخمرة له.

ب- **وسط** Eosin Methylene Blue (EMB) للتفريق بين البكتريا المخمرة للاكتوز **وللسكروز.**

5- الأوساط الأختبارية Assay Media. وهي أوساط غذائية ذات مكونات معينة لإختبارات الفيتامينات والأحماض الامينية والمضادات الحيوية مثل وسط Mueller Hinton Agar.

خطوات تحضير بيئة (وسط) زرعي جاهز داخل المختبر.

1- قراءت التعليمات الموجودة على حاوية الوسط الزرعي culture media.

2- وزن الكمية المعنية من الوسط الزرعي بواسطة الميزان الكهرباي electrical balance.

3– اذابت الكمية الموزونة في كمية من الماء المقطر اذابه تامة **في دورق مخروطي** conical flask.

4- نقل الدورق المخروطي لحاوي على الوسط الزرعي بعد تغطيتة (بغطاء بلاستيكي او بالقطن)الى الجهاز التعقيم البخاري Autoclave لتعقيم الوسط في درجة حرارة 121^{O}**م ولمدة** 15 دقيقة.

5- تترك البيئة او الوسط لتبرد بعد تعقيمة الى 55 درجه مئوية ثم يوزع في أنابيب او اطباق بتري **معقمة و بحسب حاجة التجربة.**

خطوات تحضير بيئة (وسط) زرعي شبه صناعي داخل المختبر.

المواد المستخدمة في تحضير الوسط

1- 200 **غم بطاطا**
2- 20 **غم سكر الدكستروز**
3- (15 – 20) **غم آكار**

الآكار Agar

مادة كربوهيدراتيه تستخلص من الجدار الخلوي لبعض الطحالب البحريـة الحمراء، والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابـان، وهو يتصلب عند درجـة حرارة من 42 - 45 م، ويمكن إسـالتة مرة ثانيـة عند درجـة حرارة 98 م، ويتميـز عن الجيلاتيـن كونـه لا يمكن تحليلـه بيولوجيا **لأن عدد** الكائنـات المحللة له قليلـة جدا وتتطلب كميات قليلة منه لتصلب الوسط الزرعي (نحتاج 2.5**غرام او اقل من أكار لتصلب** 100**مل من الوسط الزرعي**).

طريقة تحضير الوسط :-

1- نأخذ درنات البطاطا ونغسلها جيدا ونزن منها 200 غم ثم نقشرها ونقطعها الى مكعبات ونضعها في بيكر **حجم** 1000 مل ونضيف فوقها 1000 **مل من الماء المقطر وتوضع على الناشر لمدة** 20 دقيقة
2- نقوم بترشيح البطاطا من خلال قماش الشاش ونأخذ المستخلص يوضع في بيكر حجم 1000 **مل**
3- **نضع فوق الراشح** 20 غم من سكر الدكستروز ونمزج جيدا

نضيف 15 – 20 غم من الاكار ونمزج جيدا الى ان يختفي الاكار ثم يوضع في في دورق

4- نقل الدورق المخروطي لحاوي على الوسط الزرعي بعد تغطيتة (بغطاء بلاستيكي او بالقطن)الى الجهاز التعقيم البخاري Autoclave لتعقيم الوسط في درجة حرارة 121م^{O} ولمدة 15 دقيقة.

5- تترك البيئة او الوسط لتبرد بعد تعقيمة الى 55 درجه مئوية ثم يوزع في أنابيب او اطباق بتري معقمة و بحسب حاجة التجربة.

كلية الزراعة - جامعة واسط
المرحلة الثانية
الاحياء المجهرية العملي
المختبر الرابع **م. نور كاظم كريم الزبيدي**

تطبيقات عزل وتنقية البكتيريا من البيئات المختلفة على الأوساط المختلفة

Applications of isolation and purification of bacteria from different environments on different culture mediums.

المقدمة Introduction.

الكائنات الدقيقة ومنها البكتريا توجد تقريباً فى كل مكان فهى توجد فى المياه و التربة و الهواء والغذاء وعلى أجسامنا وفى داخلها على صورة تشكيلية مختلطة من الكائنات تختلف في مجموعها وأشكالها وتمثل هذه التشكيلة المختلطة ماتعرف بالمزرعة المختلطة **mixed culture** . ومعظم البكتيريا لا تسبب ضرراً للإنسان والحيوان والنبات ولكن قلة منها تسبب أمراض للإنسان والحيوان والنبات، ومع ذلك يجب العمل بحرص داخل مختبرات الميكروبيولوجى حتى لا يحدث تلوث للأوساط الغذائية التى ستستعمل فى عزل البكتيريا من بيئات مختلفة.

ويمكن رؤية المستعمرات بالعين المجردة لاحتوائها على عدد كبير من الخلايا البكتيرية وتختلف المستعمرات بعضها عن بعض على حسب النوع على الرغم من أن بعض المستعمرات المتشابهة قد تكون لأنواع مختلفة. وفى هذا الدرس العملى سنحاول الحصول على مزارع بكتيرية نقية **pure culture** (وهي مزرعة تحتوي على نوع واحد فقط من الاحياء المجهرية) على أطباق الأكار المغذى او على هيئة مستعمرات **colonies** أو فى أنابيب غذائية سائلة على هيئة عكارة**turbidity**.

الأهداف Objectives

1. عزل البكتيريا من البيئة المحيطه بها (الماء، التربة، الهواء،الغذاء).
2. مقارنة النمو البكتيرى على الأوساط الغذائية الصلب و السائل.
3. التفريق بين أشكال المستعمرات البكتيرية المختلفة.
4. الحصول على مزارع بكتريا نقية pure culture.

Tools and materials for the experiment الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة

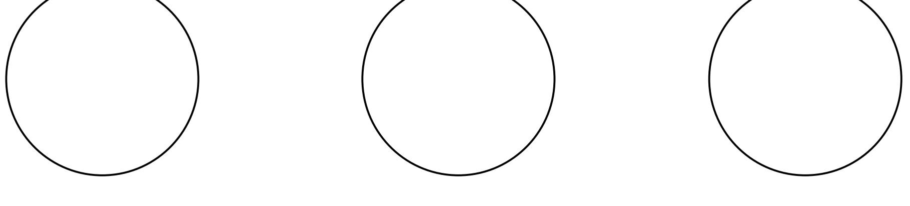
1. حمام مائي Water bath
2. حاضنة Incubator
3. أبرة التلقيح Loop & Needle
4. ثلاجة Refrigerator
5. أطباق بتري تحتوي على الأكار المغذي المعقم Petry dish contain nutrient agar
6. أنابيب اختبار تحتوى على المرق المغذى المعقم Test tube contain nutrient broth
7. أطباق وأنابيب تحتوى على ماء مقطر معقم Control contain sterile distal water
8. محلول مطهر (ديتول أو كحول) Disinfectant solution (detool or alcohol)

خطوات العمل Procedure

أولا:- تقنية التخطيط في الاطباق Streak plate technique.

وهي ابسط التقنيات المستعملة في عزل وتنقية الاحياء المجهرية كالبكتريا للحصول عليها بصورة نقية ومفردة، ويمكن انجازها باتباع الخطوات التالية :-

1. يحضر وسط زرعي صلب مثل nutrient agar ويعقم ويبرد ثم يصب في أطباق بتري معقمة sterile Petri dish ويترك لحين التصلب بدرجة حرارة المختبر.
2. تنقل باستخدام أبرة التلقيح المعقمة sterile loop عينة من مزرعة بكتريا مختلطة mixed culture الى كل طبق من هذه الاطباق وتخطط على سطح الوسط الزرعي الصلب ويكون التخطيط برفق وبأحد الاشكال التالية.



تخطيط متدرج   تخطيط متعامد   تخطيط متشابك

3. تحضن جميع الأطباق عند درجة حرارة 35 – 37م^{O} لمدة 24 – 48 ساعة مع ملاحظة تحضين الأطباق بصورة مقلوبة.

4. تسجل الملاحظات الخاصة عن المستعمرات النامية growing colonies في الاطباق من حيث الشكل والعدد بعد فترة الحضن المذكوره.

ثانيا:- تقنية الصب في الاطباق Pour plate technique.

وهي تقنية اخرى للحصول على مستعمرات بكتريا معزولة مفردة ونقية، ويمكن انجازها باتباع الخطوات التالية :-

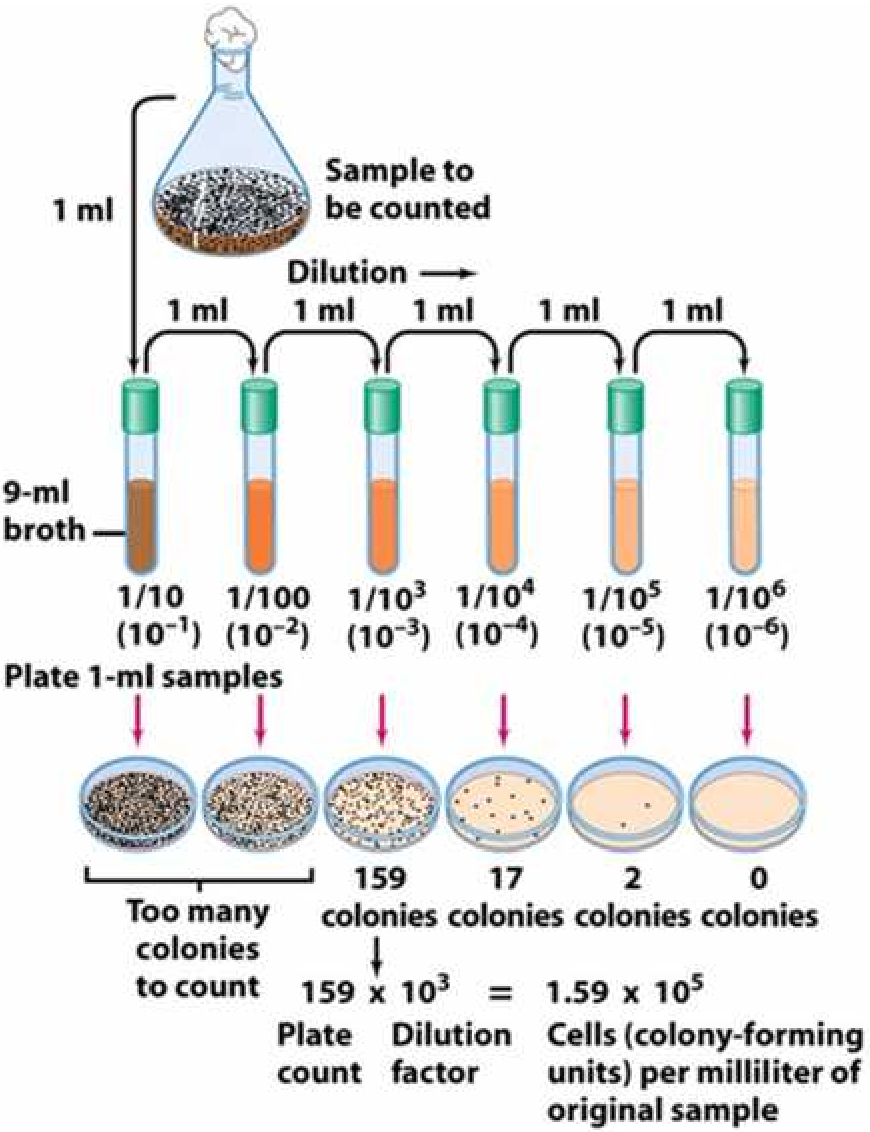
1. يتم أذابة 2 أنبوبه من الاكار المغذي لمحضر مسبقاً وتترك لتبرد بدرجة حرارة المختبر.
2. تنقل باستخدام أبرة التلقيح المعقمة sterile loop عينة من مزرعة بكتريا مختلطة mixed culture الى أنبوبة رقم (1) ثم رجها جيداً.
3. تنقل باستخدام أبرة تلقيح معقمة جديدة عينة من الأنبوبة رقم (1) إلى الأنبوبة رقم (2) ثم رجها جيداً.
4. صب الأنبوبة رقم (1) في طبق رقم (1) ، ثم صب الأنبوبة رقم (2) في الطبق رقم (2).
5. تترك الأطباق حتى تتصلب ثم تحضن بشكل مقلوبة عند درجة حرارة 37م^{O}.
6. من المحتمل بعد فترة التحضين أن يظهر بالطبق رقم (1) عدد كبير من المستعمرات بينما الطبق رقم (2) يظهر عدد قليل من المستعمرات المفردة المنعزلة عن بعضها بطريقة تمكننا من عزل كل نوع من البكتريا بصورة نقية.

ثالثا :- تقنية التخافيف dilution plate technique

1. يوزن (ا غم) تربة زراعية ويضاف إلى أنبوب اختبار حاوي على (9 مل) من الماء المقطر المعقم بذلك يتم الحصول على تخفيف 10/1 ثم يتم ملئ 9 انابيب اختبار كل انبوب بـ 9 مل من الماء المقطر المعقم
2. ينقل 1 مل من الانبوب الحاوي على عالق التربة الى الانبوب الاول من الانابيب التسعة ويرج ثم ينقا 1مل من الانبوب الاول الى الثاني ومن الثاني الى الثالث وهكذا الى ان نصل الى الانبوب التاسع
3. تنقل كميه (0.1-1 مل) من كل أنبوب إلى طبق بتري معقم ثم يصب الوسط الغذائي (درجة حرارة الوسط 50°م) تخلط العينة مع الوسط بتحريك محتويات الطبق أفقيا باتجاه وعكس عقارب الساعة مباشرة بعد صب الوسط ثم يترك ليتصلب.
4. تحضن الأطباق في حاضنة بدرجة (30°م) مدة أسبوع واحد.

5. تلاحظ المستعمرات وتعد ثم تعمل مسحه وتصبغ لمشاهدة البكتريا تحت المجهر
6. لحساب العدد الكلي للبكتريا؛ تعد المستعمرات البكتيرية في كل طبق ويسجل معدل المستعمرات لمكررات كل تخفيف (المكررلت ثلاث).
7. تسجل النتائج وينظم جدول لهذا الغرض معدل عدد المستعمرات ألمقابله لكل تخفيف وتدون مجموعة الأحياء ألمجهريه ثم يحسب عدد الخلايا في 1 غم من ألتربه الجافة بتطبيق القانون التالي:

عدد الخلايا في 1 غم تربة = (متوسط عد المستعمرات× مقلوب التخفيف) / وزن نموذج التربة (غم)



ثالثاً:- حفظ المزارع النقية وأدامتها Preservation of pure culture .

بعد خطوة عزل وتنقية خلايا الكائن الحي المجهري (البكتريا) في مزرعة نقية لابد من ايجاد وسيلة لحفظ هذا الكائن المجهري الذي تم عزلة بصورة نقية لأجل حفظ الخلايا بعيداً عن التلوث واعطائها الديمومة والحيويه لفترة مناسبة حيث يتم حفظ المزراع النقية في أنابيب اختبار محتوية على وسط زرعي صلب بشكل مائل **slant agar** او بشكل عميق **deep agar** وبعدها تحفظ في الثلاجة مع تجديد هذة العزلة وتنشيطها بين فترة واخرى لاتتجاوز ثلاثة اشهر بالنسبة للبكتريا ويفضل حفظ المزارع النقية في الانابيب بدلاً من الاطباق لأنها تكون اقل عرضة للتلوث واقل انشغالاً للحيز داخل الثلاجة واسهل تداول، ولحفظ المزارع المايكروبية نتبع الخطوات التالية :-

1. يحضر وسط زرعي صلب مثل nutrient agar ويعقم ويبرد ثم يصب في أنابيب اختبار معقمة sterile test tube بشكل مائل slant agar او عميق deep agar ثم يترك لحين التصلب بدرجة حرارة المختبر.
2. تنقل باستخدام أبرة التلقيح المعقمة sterile loop عينة من مزرعة بكتريا نقية pure culture الى أنابيب الأختبار وتمزج جيداً مع الوسط الزرعي.
3. تنقل الأنابيب الى الحاضنة وتترك عند درجة حرارة 37م^{O} لمدة 15 – 20 ساعة وبعدها تنقل الأنابيب الى الثلاجة.

كلية الزراعة - جامعة واسط
المرحلة الثانية
الاحياء المجهرية العملي
المختبر السادس م. نور كاظم كريم الزبيدي

صبغات الكرام التفريغية Grams Stain

المقدمة Introduction.

تعتبر صبغة كرام Gram stain من الصبغات المهمة التى يستفيد منها العلماء عند تقسيم وتعريف البكتيريا، وهى تعتبر من الصبغات التفريقية differential stain التى تستطيع من خلالها تقسيم خلايا البكتيريا الى مجموعتين رئيستين الأولى خلايا بكتيريا موجبة لصبغة كرام وهى الخلايا التي يسمح الجدار الخلوي فيها بنفاذ الصبغة مما يؤدى إلى تلون السايتوبلازم باللون البنفسجى **crystal violet** وعند غسل الخلايا بالكحول فان بعض الخلايا لا تسمح بخروج الصبغة مرة أخرى وبذلك تحتفظ باللون البنفسجى وتعرف هذه البكتريا بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام **Gram positive** أما الثانية هي الخلايا البكتيرية التى لا يستطيع جدارها الاحتفاظ بالصبغة ويمكنها آن تصبغ بصبغة معاكسة مثل صبغة السفرانين **Safranin** الوردية او الحمراء وتعرف هذه بالبكتريا السالبة لصبغة كرام **Gram negative**.

يعود السبب في إختلاف الخلايا البكتيرية فى تفاعلها مع صبغة كرام الى الأختلاف فى الصفات الفيزيائية والكيميائية لجدار الخلية البكتيرية ، فالخلايا الموجبة لصبغة كرام **(Gram +ve)** تحتوى على طبقات عديدة من الببتيتدوكليكان (المورين). ولمركب المعقد الذى يتكون من محلول الكريستال البنفسجى مع محلول اليود لا يستطيع المرور من داخل الخلية الى خارجها خلال الطبقات العديدة من الميورين لذلك تحتفظ باللون البنفسجي . أما فى البكتيريا السالبة لصبغة كرام **(Gram -ve)** فإن الكحول يذيب طبقة الدهون التى تكسو طبقة الببتيتدوكليكان الرقيقة (طبقة واحدة رقيقة فقط) ولذلك يسهل خروج الصبغة خلال هذه الطبقة عند الغسيل بالكحول.

توجد عدة اختلافات بين تركيب الجدار الخلوى للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام كمافي الجدول ادناه .

Gram Negative Bacteria (G^-)	Gram Positive Bacteria (G^+)	Characteristic الخاصية
10 - 15 nm	20 - 25 nm	1. سمك الجدار Thickness of wall
طبقتين	طبقة واحده	2.عدد الطبقات في الجدار Number of layers in wall
اقل حساسية	اكثر حساسية	3.الحساسية للبنسلين Sensitive of penicillin
غير موجود	موجود	4.حامض التيكويك في الجدا Teichoic acid in wall
نسبة منخفضة (10-20% من الوزن الجاف للجدار)	نسسبة عالية (50 % من الوزن الجاف للجدار)	5. سمك طبقة الببتيدوكليكان Peptidoglycan content
نسبة عالية (20 % من الوزن الجاف للجدار)	نسبة منخفضة (2 % من الوزن الجاف للجدار)	6.محتوى الدهون Lipid and lipoprotein content
Escherichia Coli *Shigella dysentery* *Salmonella typhus* *Enterobacter aerogens*	*Staphylococcus aurous* *Clostridium spp.* *Bacillus spp.* *Lactobacillus spp.*	7. الأنواع البكتريا الشائعة Common bacteria species

Objectives الأهداف

1. التعرف على المجاميع المختلفة من البكتيريا بعد تصبيغها بصبغة كرام .
2. معرفة الفرق بين الصباغة البسيطة (السالبة والموجبة) والصباغة التفريقية (صبغة كرام) .
3. معرفة الفرق ما بين البكتيريا الموجبة لصبغة كرام Gram positive والبكتيريا السالبة لصبغة كرام Gram negative .

Tools and materials for the experiment الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة

1. مصباح بنزين	Bunsen burner
2.أبرة التلقيح	Loop & Needle
3.شرائح زجاجية نظيفة	Clean glass slid
4. مزارع بكتريا مختلفة	Bacterial culture
5. ماء مقطر	Distil water
6. محلول الكريستال البنفسجى	Crystal violet
4. محلول اليود	Iodine Solution
5. كحول إثيلى 95%	Ethanol 95%
6. محلول السفرانين	Safranin

Procedure خطوات العمل

أولآ:- مكونات صبغة كرام Gram stain حسب تسلسل استخدامها في عملية التصبيغ.

1. Crystial violet
2. Iodine Solution
3. Ethanol 95%
4. Safranin (counter stain)

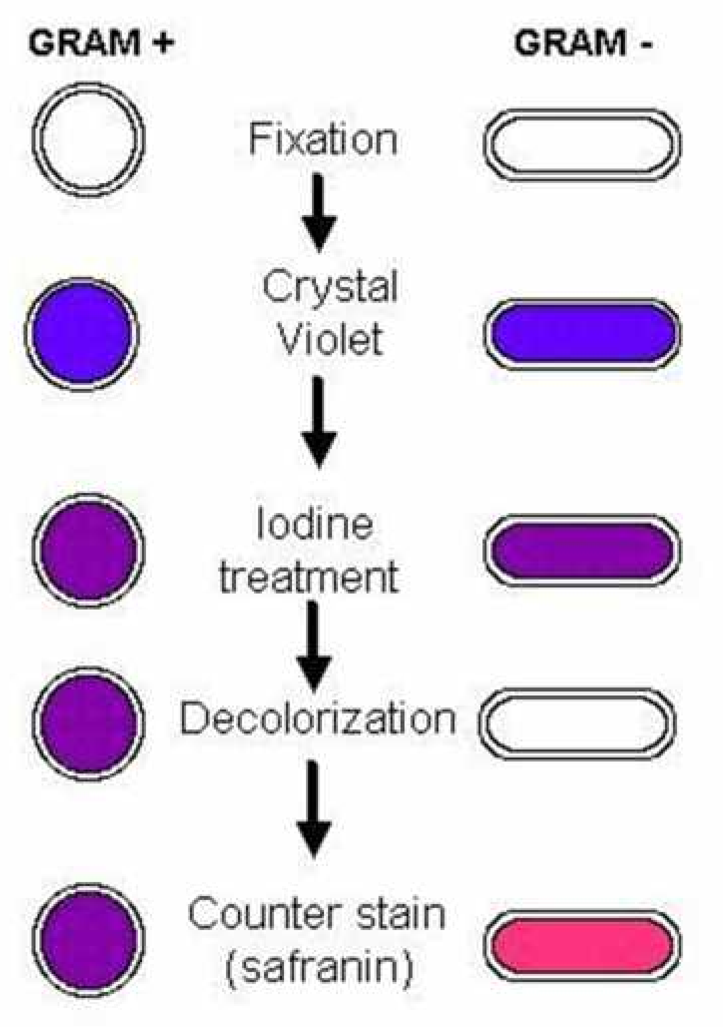
ثانيآ:- خطوات التصبيغ Steps of stains.

1. يحضر غشاء بكتيرى **(smear)** من المزرعة النامية على أنابيب الأكار المائل أو على أطباق الأكار المغذى.
2. يثبت الغشاء بإستعمال اللهب والتأكد من عدم تعرض الغشاء للحرارة العالية .
3. تضاف عدة قطرات من الكرستال البنفسجي الى غشاء البكتريا ويترك لمدة دقيقة واحدة.
4. يغسل الغشاء بإحتراس بالماء المقطر ويجب أن تكون الشريحة بشكل مائل أثناء الغسل.
5. يضاف للغشاء قبل أن يجف قطرات من محلول اليود ويترك لمدة دقيقة واحدة.
6. يضاف عدة قطرات من الكحول الأثيلى (95 %) الى الغشاء و الأستمر بالأضافة حتى نلاحظ عدم تلون الكحول المتساقط من على الشريحة.

7. بسرعة ورفق يغسل الغشاء بالماء ثم يضاف بعد ذلك قطرات من محلول السفرانيين لمدة نصف دقيقة.

8. يغسل بالماء المقطر لأزالة الصبغة الزائدة ثم يجفف الغشاء ويفحص بإستعمال العدسة الزيتية.

9. تلاحظ ان البكتريا قيد الفحص اما تكتسبت للون الصبغة الاولى وهي صبغة الكريستال البنفسجي **Crystal violet** فتظهر تحت المجهر باللون البنفسجي **(Purple)** يطلق عليها موجبة لصبغة كرام **(Gram positive)** او تكتسب اللون الصبغة الاخيرة وهي السفرانين **(Safranin)** فتظهر باللون الأحمر او الوردي (**Red or Pink**) يطلق عليها سالبة لصبغة كرام **(Gram Negative)**.



كلية الزراعة – جامعة واسط

المرحلة الثانية

الاحياء المجهرية العملي

المختبر السابع　　　　　　　　　　　　　　م. نور كاظم كريم الزبيدي

التصبغ السالب Negative Staining

الاهداف :-

يهدف هذا النوع من التصبيغ الى التعرف على الشكل المورفولوجي للبكتريا حيث يستخدم فية صبغات حامضية أي التي تتنافر مع خلايا البكتريا ذات الطبيعة الحامضية ايضآ ، حيث ان الصبغة لا تدخل الى داخل الخلية البكتريا ولا تصتبغ بها فتبقى الصبغة خارج الخلية وتعمل على تلوين محيط الخلية بلون الصبغة المستخدمة

الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة Tools and materials for the experiment

1. أبرة التلقيح Loop & Needle
2. شرائح زجاجية نظيفة Clean glass slid
3. مزارع بكتريا مختلفة Bacterial culture
4. الصبغه السالبة Nigrosin or Fuchsin

وتتم عملية التصبيغ باتباع الخطوات التالية :-

1- على شريحة زجاجية نظيفة توضع قطرة او قطرتين من احد الصبغات السالبة (NigrosinاوFuchsin)

2- باستخدام ابرة تلقيح معقمة (Loop) تنقل عينة من النموذج المراد فحصة وتمزج مع الصبغة .

3- باستخدام شريحة زجاجية ثانية نظيفة يتم نشر المزيج الذي يتكون من الصبغة و العينة البكترية على طول الشريحة بامرار حافة شريحة ثانية ويوزع المزيج على طول الشريحة الاولى

4- تترك الشريحة الى ان تجف تماماً وتفحص تحت المجهر باستعمال العدسة الصغرى ثم العدسة الزيتية   حيث تلاحظ الخلايا شفافة (غير مصبوغة) تتلألأ في محيط اسود مصبوغة بلون صبغة النيكروسين الاسود

ملاحظة

في هذا النوع من التصبيغ (التصبيغ السالب) لا يستخدم التجفيف باستخدام اللهب لأن الغرض من هذا التصبيغ التعرف على شكل و حجم الخلايا المجهرية ولأن التجفيف يؤدي الى انكماش خلايا الاحياء المجهرية وبالتالي عدم التعرف على الصفات الظاهرية لخلايا البكتريا مثل الشكل و حجم..

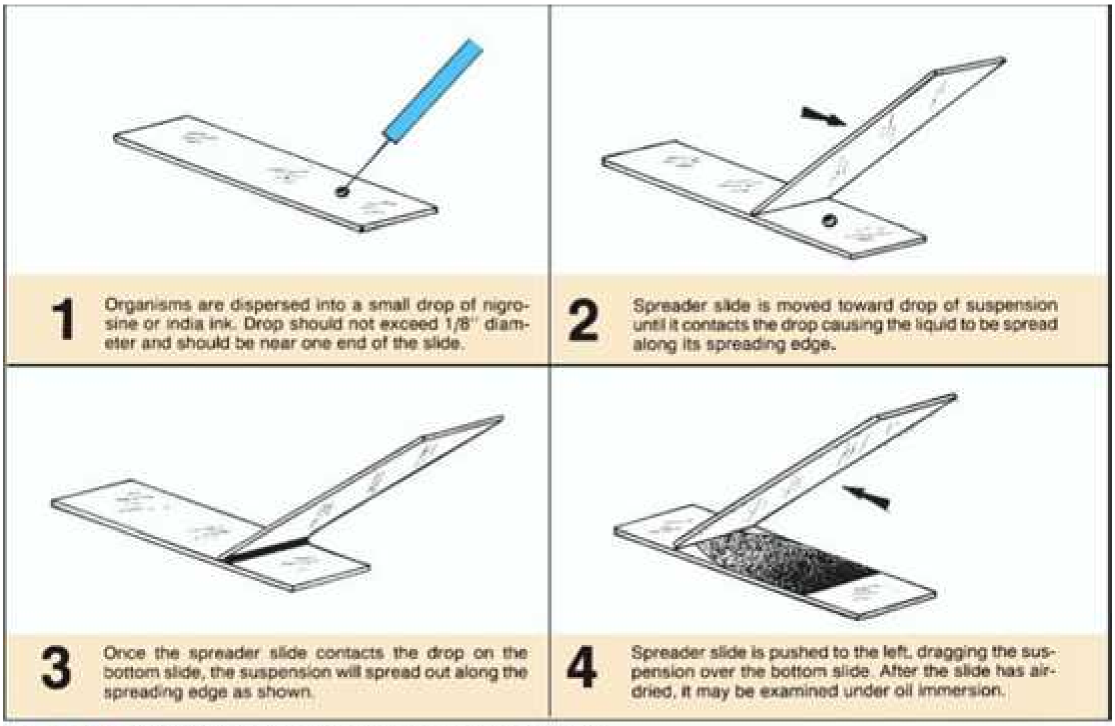


Figure 11.1 Negative staining technique, using a spreader slide

****

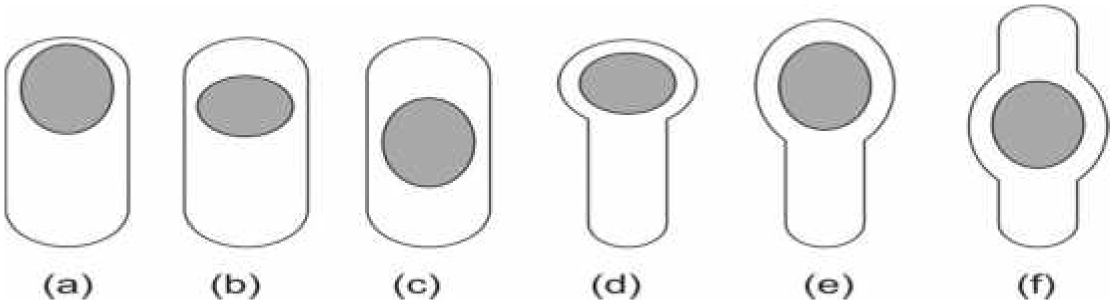
تصبيغ السبورات الدخلية Endo Spore Staining

السبورات (Spores):-عبارة عن تراكيب خلوية تنشأ داخل الخلايا البكتريا المكونة الها (البكتريا الموجبة الصبغة كرام) عند مرور الخلايا البكتريا (الخلايا الام) بظروف بيئية وتغذوية

ادنى من الظروف المثالية وهذة السبورات تستطيع مقاومة الظروف الخارجية الشديدة كالضغط والحرارة العالية والجفاف والارقم الهدروجنية المتطرفة.

تحتوي للسبورات على حامض Dipicolinic acid ونسبة عالية من املاح الكاليسيوم وهذان المركبان مسؤولآ عن مقاومة السبورات للظروف الخارجية الشديدة .

يختلف موقع السبورات من بكتريا الى اخرى فقد يكون موقعها طرفي terminal spore او تحت طرفي sub terminal spore او مركزي central spore او منتفخآ swollen spore



- والملاحظ ان معظم البكتريا بل ان الغالبية العظمى منها القادرة على تكوين السبورات هي موجبة لصبغة كرام

- وتعود البكتريا المكونة للسبورات الى جنس <u>Bacillus</u> وهي هوائية aerbic و جنس <u>Clostridiium</u> وهي الاهوائية anaerobic وكلاهما بكتريا عصوية bacilli موجبة لصبغة كرام Gram positve

- الاتعد السبورات هي وسيلة تكاثرية لخلايا البكتريا لأن كل خلية بكتريا تكون سبور واحد ونما هي وسيلة لحفظ النوع.

<u>Tools and materials for the experiment الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة</u>

1. مصباح بنزين Bunsen burner
2. أبرة التلقيح Loop & Needle
3. شرائح زجاجية نظيفة Clean glass slid
4. مزارع بكتريا مكونة للسبورات
5. ماء مقطر Distil water
6. محلول الملاكايت الاخضر Malachite green
7. محلول السفرانين Safranin

<u>خطوات تصبيغ السبورات الداخلية Endo Spore</u>

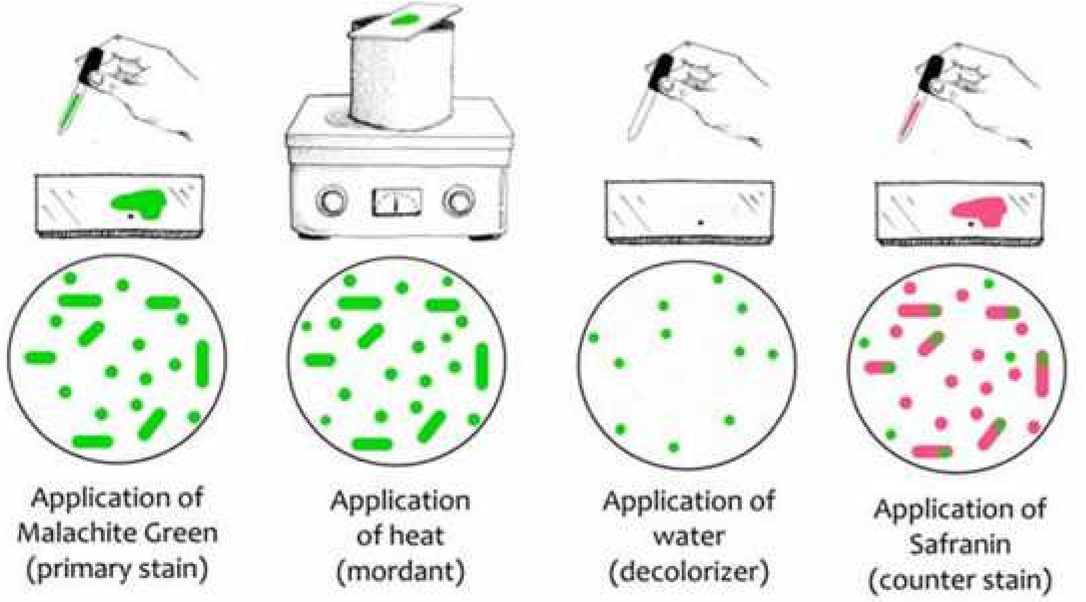
1- يحضر غشاء smear من البكتريا المكونه للسبورات .

2- توضع قطرات من صبغة الملاكايت الاخضر Malachite green بحيث تغطي الغشاء ثم يتم تجفيف العينة وباستخدام ماسك الشرائح الزجاجية بأمرارها وبمسافة بعيدة عن اللهب مرتين **او ثلاث مرات** او بمرار الشريحة الزجاجية على بخا ر حمام مائي مغلي لمدة 5 **دقائق مع** الاستمرار باضافة كميات قليلة جدآ من الصبغة الهدف منها هو لعدم حصول حالة جفاف للعينة البكتريا .

3- تبرد الشريحة الزجاجية ثم تزال الصبغة الزائدة من فوق الشريحة الزجاجية باستخدام الماء **المار بسرعة**

4- تضاف قطرة الى قطرتين من صبغة السفرانين فوق المسحة البكتريا و تترك هذة الصبغة على المسحة لمدة نصف دقيقة .ثم تزال الصبغة الزائدة بالماء .

5- تجفف الشريحة الزجاجية اما تجفيف هوائي او امرارها عن بعد من اللهب .ثم تفحص تحت المجهر باستخدام العدسة الصغرى ثم العدسة الزيتية .حيث يلاحظ تلون السبور باللون الاخضر في وسط الخلية وتلون الاجزاء الخضرية بالون الوردي اواللون الاحمر .....



كلية الزراعة – جامعة واسط
المرحلة الثانية
الاحياء المجهرية العملي
المختبر الثامن م. نور كاظم كريم الزبيدي

فحص حركة البكتيريا بطريقة القطرة المعلقة

Examination of movement of bacteria by Hanging drop

المقدمة Introduction.

تختلف أنواع البكتريا من حيث قدرتها على الحركة، فمعظم البكترية الكروية Cocci غير متحركة (non motile)، بينما معظم البكتريا العصوية Bacilli قادرة على الحركة (motile)، وتهدف الاحياء المجهرية (البكتريا) من خلال حركتها الى الابتعاد عن المؤثرات الخارجية كالحرارة والضوء، وكذلك البحث عن المواد الغذائية و الأقتراب من المواضع التي تتوفر فيها ظروف بيئية ملائمة للنمو .

انواع الحركة فى البكتريا Types of movement in bacteria

1. حركة زاحفة gliding motion. تقوم بهذه الحركة بكتريا Mycobacterium التى تتحرك بالانقباض والانبساط على الاسطح الصلبة، وتفرز هذه البكتريا مواد لزجة على هذه الاسطح فتسهل من حركتها.
2. الحركة اللولبية Rotatory motion. تقوم بهذه الحركة بكتريا Spirochetes التى تتميز بمرونة جدارها الخلوى وبخلوها من الاسواط ، يرجع السبب فى هذا النوع من الحركة الى وجود الألياف المحورية axial fibers والتى تسمى ايضا بالاسواط الداخلية Endo flagella التى تقع فى المنطقة الواقعة بين الغشاء البلازمى والجدار الخلوى والتي تدعى بـالبريبلازم، وتعمل التواءات وانثناءت هذه الاليياف على حركة البكتريا فى السوائل.
3. الحركة بواسطة الاسواط Flagella (الحركة الانتقالية). الكثير من البكتريا العصوية والضمية تحتوى على اعضاء خاصة للحركة تسمى الاسواط Flagella وهي عبارة عن تراكيب خيطية رفيعة وطويلة تنشأ من الغشاء السايتو بلازمي مخترقآ الجدار الخلوي وتتوزع الاسواط بانماط مختلفة على خلايا البكتريا تبعآ للجنس او النوع.

تقسيم البكتريا على أساس الأسواط Dividing the bacteria by flagella

1. بكتريا عديمة الأسواط Atricous. وهى البكتريا التى لا تحتوى على اسواط مثل البكتريا الكروية Cocci وتنتقل هذه الأنواع من مكان لأخر بحركة الهواء أو الماء أو الحركة الميكانيكية من خلال التصاقها بالأشياء.

2. بكتريا مزودة بالأسواط Tricous. البكتريا التى تحتوى على أسواط مثل البكتريا العصوية Bacilli وتختلف عدد الأسواط حسب نوع البكتيريا فمنها ما يحمل سوطاً واحداً ومنها ما يحمل أثنى عشر سوطا أو أكثر وتتميز البكتيريا المسوطة بثبوت عدد الأسواط وموضعها وترتيبها مما يجعلها صفة تصنيفية على جانب كبير من الأهمية .

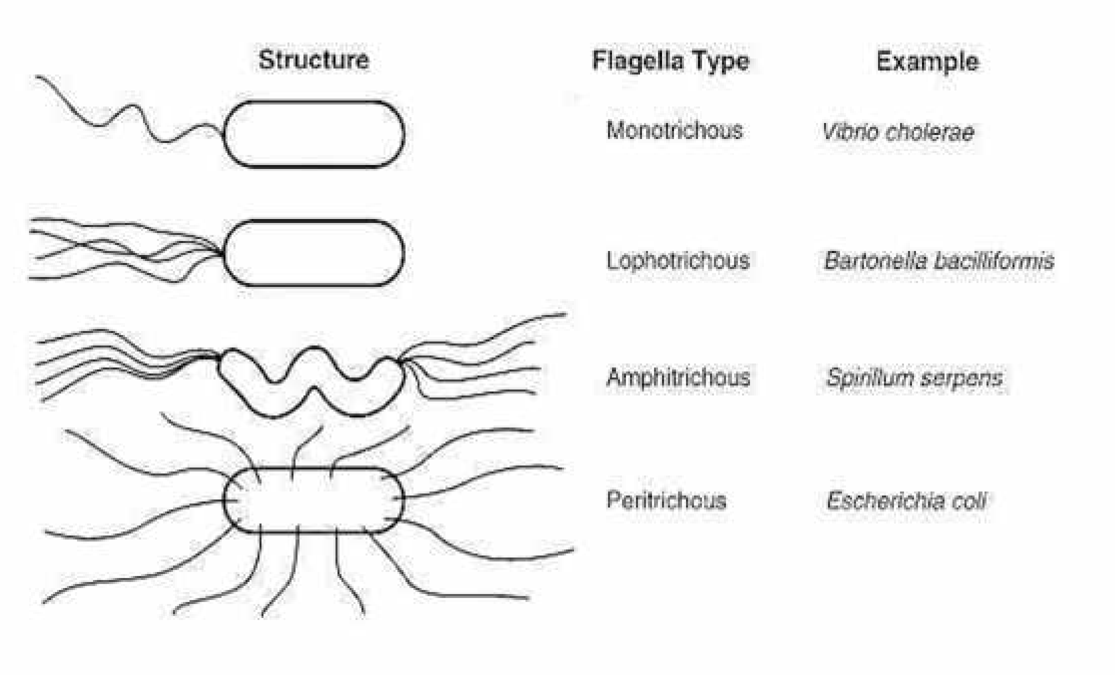
تقسم البكتيريا من حيث توزيع الأسواط على الخلية البكترية.

1. وحيدة السوط monotrichous.وفيها يخرج سوط واحد من أحد قطبى الخلية البكتيرية، مثل بكتريا Vibrio cholerae.

2. سوطية الطرف lophotricous. وفيها تخرج حزمة سوطيه من قطب واحد في الخلية البكتيرية، مثل بكتريا Bartonella bacilliformis.

3. سوطية الطرفين amphitrichous. وفيها يخرج سوط واحد أو حزمة سوطيه من كل قطب من قطبى الخلية البكتيرية، مثل بكتريا Spirillum serpens .

4. محيطية الأسواط Peritrichous. وفيها تنتشر الآسواط من جميع الاتجاهات حول سطح الخلية البكتيرية، مثل بكتريا Escherichia coli .



Objectives الأهداف

1. التحري عن حركة البكتريا بطريقة القطرة المعلقة **Hanging drop method**=.
2. معرفة الفرق بين البكتريا المتحركة **(motile)** والبكتريا الغير متحركة **(non motile)** .
3. معرفة انواع الحركة في البكتريا .
4. التعرف على أشكال ومواقع الأسواط المختلفة للبكتيريا .

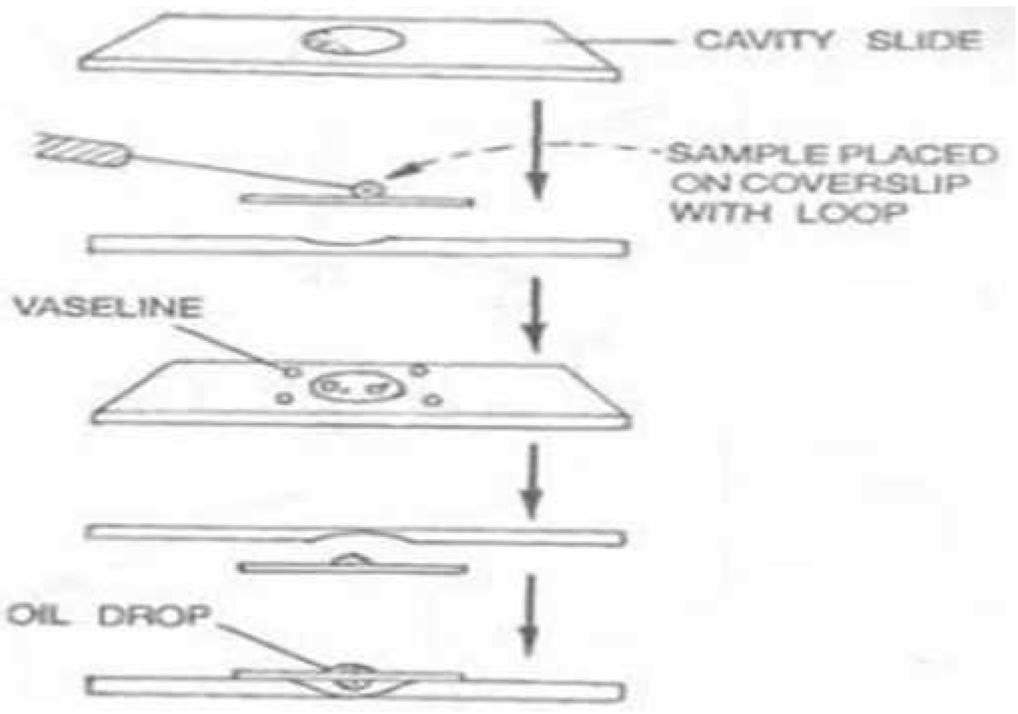
Tools and materials for the experiment الأدوات والمواد اللأزمة للتجربة

1. مجهر ضوئي مركب — Light compound microscope
2. أبرة التلقيح — Loop & Needle
3. شرائح زجاجية مقعرة نظيفة — Convex slid
4. اغطية شرائح زجاجية نظيفة — Cover slid
5. **ماء مقطر** — Distil water
6. عينة مياة ملوثة — Water contaminant sample

Procedure خطوات العمل

تستخدم طريقة بسيطة في متابعة حركة الاحياء المجهرية تسمى بطريقة القطرة المعلقة Hanging drop method التي تحضر باستخدام شريحة مقعرة Convex slid وغطاء شريحة Cover slid ،ويمكن انجازها باتباع الخطوات التالية :-

1. تنقل باستخدام أبرة التلقييح المعقمة sterile loop عينة من مزرعة بكتريا مختلطة (عينة من ماء راكد او ملوث) وتوضع في وسط غطاء الشريحة cover slid.
2. ترطب حواف غطاء الشريحة من موضعين او ثلاثة بواسطة قطرة ماء مقطر محمولة على اللوب loop وبطريقة الملامسة حيث ان قطرات الماء في حافة الغطاء تساعد على الالتصاق الغطاء بالشريحة المقعرة بطريقة الشد السطحي.
3. يوضع الغطاء على سطح مستوي ثم تقلب عليه الشريحة المقعرة convex slid بحيث يكون موضع قطرة المزرعة المختلطة في وسط منطقة التقعر ثم اقلب الشريحة المقعرة مع غطاء الشريحة.
4. تفحص الشريحة تحت المجهر باستخدام العدسة الصغرى و العدسة الكبرى مسلطآ ضوء العدسة على منطقة القطرة المعلقة ولاحظ حركة الاحياء المجهرية ثم سجل الملاحظات إثناء الفحص.


CAVITY SLIDE
SAMPLE PLACED
ON COVERSLIP
WITH LOOP
VASELINE
OIL DROP

كلية الزراعة – جامعة واسط

المرحلة الثانية

الاحياء المجهرية العملي

المختبر التاسع **م. نور كاظم كريم الزبيدي**

الفحص المايكرو بايلوجي للماء Bacteriology Examination

يعد الماء صالحاً للشرب متى ما كان خالياً من الاحياء المجهرية المرضية pathogenic التي يحتمل انتقالها عن طريق الماء مثل مسببات حمى التيفوئيد و الزحار و الكوليرة بمافيها بعض انواع الفايروسات كشلل الاطفال polioviruses و التهاب الكبد hepatitis .

ان المسببات المرضية لاتوجد الا اذا كان الماء ملوث ببراز الانسان او الحيوان ولما كان **الكشف عن** هذه المسببات يحتاج الى وقت ومهارة عالية ومواد قد لاتتوفر في بعض **المختبرات** لذا يستعان عنها بما يسمى ببكتريا الكشف Indicator bacteria ومنها بكتريا القولون Coliform bacteria والتي تشتمل على جميع انواع البكتريا و التي تتصف بأنها عصوية Rod **،سالبة الصبغة كرام** Gram Nagetive وهوائية aerobic او لاهوائية اختيارية anaerobic Facultative ، غير مكونة للسبورات non spor forming **مخمرة لسكر للاكتوز** Lactose fermentation تنتج عنه حامض وغاز بعد مرور 48**ساعة في درجة** 35 **م** ومن اكثر هذه المجموعة انتشاراً وشيوعاً والتي تسبب الامراض هي بكتريا *Enterobacter aerogenes* **و** *Escherichia coli* وهذه **الا**نواع تتواجد في امعاء الانسان السليم و المريض معاً وملايين منها تطرح يومياً مع البراز .

ان وجود مجموعة القولون Coliform group في ماء الشرب يعد دليلاً على احتمال تلوث الماء بالبكتريا المرضية .

<u>- خطوات الفحص عن بكتريا القولون</u>

اولاً:- الفحص الاحتمالي presumptive test

1- ينقل مللتر واحد من الماء قيد الفحص الى انابيب اختبار يحتوي كل منهاعلى 5 مل من Lactose broth وتحتوي على انابيب صغيرة موضوعة بصورة مقلوبة في داخل هذا الوسط السائل تسمى درهم تيوب Durham tube انابيب درهم .

2- تحضن الانابيب بدرجة حرارة 35م ولمدة 24 ساعة ويلاتكون غاز الذي يكون دليلاً اولي على وجود مجموعة القولون .

3- تنقل الانابيب الى مرحلة الاختبار الاتية اما الانابيب الخالية من الغاز تعاد الى الحاضنة بدرجة 35م ولمدة 24 ساعة للتأكد من خلوها من مجموعة القولون .

ثانياً:-الفحص التأكيدي Confirmed test

1- تنقل مسحة من وسط Lactose broth الموجب للاختبار لاحتمالي بوسطة اللوب وتخطط على سطح أحد الاوسط المتخصصة مثل Eosin Methylen blu Agar (E-M-B-Agar) .

2- تحضن هذة الاطباق بدرجة 35م ولمدة 24ساعة مع ملاحظة تكون مستعمرات تعود الى مجموعة القولون ولاسيما *Escherichia coli* هذة البكتريا تكون مستعمرات خضراء لماعة معدنية او مستعمرات بنفسجية كبير الحجم تعود الى جنس *Enterobacter aerogenes* وفي حالة عدم ظهور مستعمرات بالمواصفات التي ذكرت يتم الانتقال الى المرحلة الاخيرة .

ثالثاً:- الفحص التكميلي Completed test

1- يتم انتقاء عدد من مستعمرات بكتريا القولون ومستعمرات لاتمثل بكتريا القولون الى وسط Lactose broth و كلاً على انفراد و تحضن في درجة 35م ولمدة 24ساعة لملاحظة تكون الغاز .

2- كما تنقل مسحة او عينة من المستعمرات التي وقع عليها الاختبار الى وسط Nutrient Agar على شكل slant (انابيب مائله) وتحضن بدرجة 35م ولمدة 24 ساعة ثم تجري عليها الفحوصات المجهرية للتأكد من عائدتها الى مجموعة بكتريا القولونمن حيث انها عصوية Rod، سالبة لصبغة كرام Gram Nagetive ، غير مكونة للسبورات non spor forming.