الميكروبيولوجيا العامة

الجزء العملي

السنة: الثانية

القسم: العلوم البيئية

منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

الميكروبيولوجيا العامة

الجزء العملي

ميساء بكور الزيات
مديرة أعمال في قسم العلوم البيئية

جامعة دمشق
١٤٤١ – ١٤٤٢ هـ
٢٠١٩ – ٢٠٢٠ م

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفهرس

الموضوع	الصفحة
المقدمة	١١
الفصل الأول: توجيهات وإرشادات عامة	١٣
مواصفات مختبر الأحياء الدقيقة	١٣
الملاحظات والتوصيات الواجب اتباعها في المختبر الجرثومي	١٥
تنظيف الأدوات الزجاجية	١٩
الفصل الثاني: الأدوات والتجهيزات المستعملة في المختبرات الجرثومية	٢١
الأدوات المستعملة في مختبر الأحياء الدقيقة	٢١
الأجهزة المستعملة في مختبر الأحياء الدقيقة	٢٣
الفصل الثالث: التعقيم	٣٧
تعريف التعقيم	٣٧
آلية التعقيم	٣٧
ضبط عملية التعقيم	٣٨
طرائق التعقيم	٣٩
١ – التعقيم بالحرارة	٣٩
٢ – التعقيم بالأشعة	٤٦

٣ – التعقيم بالترشيح ٤٧
٤ – التعقيم بالغازات وأبخرتها ٤٩
٥ – التعقيم الكيميائي ٥٠
المطهرات ٥١
تعريفها ٥١
آلية تأثيرها ٥١
أنواع المطهرات ٥٢
الفصل الرابع :أوساط الاستزراع ٥٩
تعريف أوساط الاستزراع ٥٩
الشروط الواجب تأمينها في الأوساط المغذية ٦١
أنماط أوساط الاستزراع ٦٢
الفصل الخامس: مدخل إلى علم الجراثيم ٦٥
الصفات العامة للجراثيم ٦٥
تعريف الجراثيم ٦٥
أشكال الجراثيم ٦٦
الفصل السادس: تقانة الزراعة العقيمة وطرائق الاستزراع ٧١
المحاذير التي يجب ملاحظتها عند أخذ النماذج الجرثومية وزرعها ٧١
طرائق تحضير المزارع الجرثومية ٧٣
طرائق الاستزراع ٧٣
أولاً : الاستزراع في الأنابيب ٧٣

ثانياً : الاستزراع في الأطباق ٧٥
صفات المزارع و نمط النمو ٨١
عزل المزارع الجرثومية ٨٥
طرائق حفظ المزارع الجرثومية ٨٦
الفصل السابع: تقدير عدد الخلايا الجرثومية في عينة ما ٨٩
١- الطرائق المجهرية ٨٩
٢- طريقة الأطباق ٩٢
٣- طريقة الوسط السائل ٩٣
٤- طريقة الترشيح الغشائي ٩٤
الفحص الميكروبيولوجي للحليب ٩٦
مصادر تلوث الحليب ٩٦
معايير تصنيف جراثيم الحليب ٩٧
اختبارات الكشف عن جراثيم الحليب ٩٨
١- اختبار إحصاء الجراثيم في الحليب باستعمال طريقة الأطباق ٩٩
٢- اختبار الإنزيمات المرجعة ١٠٣
الفصل الثامن: استزراع الجراثيم اللاهوائية المجبرة ١٠٧
الوسائط المستعملة لنزع الأكسجين من أوساط الاستزراع ١٠٧
الطرائق المستعملة في زرع الجراثيم اللاهوائية ١٠٨
دراسة أشكال المستعمرات النامية لاهوائياً ١١١
الفصل التاسع: الفحص المجهري للجراثيم ١١٣

١- الفحص المباشر ١١٤
دراسة الحركة عند الجراثيم ١١٤
٢- الفحص بعد التثبيت والتلوين ١١٧
طبيعة الملونات ١١٧
تحضير النموذج للتلوين ١١٩
طرائق التلوين ١٢٢
١- التلوين البسيط ١٢٢
٢- التلوين السلبي ١٢٣
٣- التلوين المركب ١٢٤
- طريقة صبغة غرام ١٢٦
- طريقة زيل – نلسون ١٣٢
- طريقة فونتانا ١٣٥
- طريقة ورث – كونكلين ١٣٧
- طريقة ليفسون ١٣٨
- طريقة ولتش ١٤١
- طريقة الحبر الصيني ١٤٢

الفصل العاشر: دراسة بعض خواص الجراثيم وتحديد أنواعها ١٤٥
١ – انتشار الأحياء الدقيقة ١٤٦
٢ – تحديد حاجة الجراثيم لأكسجين الهواء ١٤٩
٣ – تأثير درجة الحرارة في نمو الجراثيم ١٥٢
٤ – تأثير الـ pH في نمو الجراثيم ١٥٧

٥ – تأثير المواد المضادة للجراثيم ١٥٨
٦ – دراسة الخصائص الحيوية الكيميائية للجراثيم ١٦٢
آ: اختبارات استقلاب السكريات بوساطة الجراثيم ١٦٣
١– اختبار تخمر السكريات ١٦٣
٢– اختبار تحلل النشاء ١٦٦
ب : اختبارات تحلل البروتين ١٦٩
١– إماهة الهلام ١٦٩
٢– إماهة الكازئين ١٧٣
٣– اختبار إنتاج الإندول ١٧٥
٤– اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين ١٧٧
ج – اختبارات متفرقة ١٧٩
١– النمو على وسط لايحتوي إلا على الكربون اللاعضوي ١٧٩
٢– اختبار نشاط الكتالاز ١٨٢
الفصل الحادي عشر: الجراثيم الممرضة ١٨٥
العلاقة بين المضيف والجراثيم ١٨٥
تشخيص الجراثيم الممرضة ١٨٦
المكورات إيجابية الغرام ١٨٧
العنقوديات الذهبية ١٨٧
العصيات سلبية الغرام ١٨٩
فصيلة الأمعائيات ١٨٩
العصية القولونية ١٩٠

العصية التيفية ١٩٣
الفصل الثاني عشر: الفطريات ١٩٥
أهمية الفطريات - فوائدها ومضارها ١٩٦
أشكالها ١٩٧
التكاثر ١٩٧
عزل الفطريات الدقيقة من التربة وإحصاؤها ١٩٨
تصنيف الفطريات ٢٠٤
الفصل الثالث عشر: الطحالب ٢١٧
أهمية الطحالب - فوائدها ومضارها ٢١٧
أشكالها ٢١٩
جمع الطحالب والعوالق النباتية وتحضيرها للدراسة وحفظها ٢١٩
استزراع الطحالب ٢٢١
تصنيف الطحالب ٢٢٣
دليل أوساط الاستزراع ٢٣٩
دليل الصبغات والكواشف ٢٥٧
المصطلحات ٢٦١
المصادر و المراجع العربية ٢٧٥
المصادر والمراجع الأجنبية ٢٧٧

مقدمة

تتناول موضوعات هذا الكتاب مفردات منهج (عملي مقرر الميكروبيولوجيا العامة لطلاب السنة الثانية- قسم العلوم البيئية)، من كلية العلوم في جامعة دمشق، ويهدف بالدرجة الأولى إلى التعريف بالأحياء الدقيقة (الجراثيم Bacteria والفطريات Fungi والطحالب Algae) من الناحية العمليّة، لتُتَمّم ما جاء في الجزء النظري من هذا المقرر؛ الذي يُعدّ من المقررات الأساسية لدراسة عدد من المسائل المتعلقة بحياة الإنسان والحيوان والنبات والبيئة المحيطة.

لقد روعيَ في هذا الكتاب السلاسة والتسهيل في عرض معظم الموضوعات المتعلقة بعملي الأحياء الدقيقة، وبما يناسب الزمنَ المخصص لتدريس هذا المقرر. حيث بدأ بعرض مواصفات مختبر الأحياء الدقيقة والملاحظات والتوصيات الواجب اتباعها فيه.

ثم عُرضت الأدوات والتجهيزات الخاصة بمختبرات الأحياء الدقيقة، والمجاهر، وتقانات الفحص المجهري، وطرائق التعقيم، وبعض المطهرات، وأوساط الاستزراع، وطرائق الاستزراع. كما عُرضت طرائق استزراع الجراثيم اللاهوائية، وبعضاً من طرائق تقدير عدد الخلايا الجرثومية في عينة ما، وخُصص دراسة عمليّة لتقدير عدد الخلايا الجرثومية في الحليب.

ثم جاءت دراسة بعض خصائص الجراثيم الحيوية والحيوية الكيميائية وتحديد أنواعها، ودراسة بعض الجراثيم الممرضة الأكثر انتشاراً.

وعُرض بإيجاز معلومات عن الفطريات الدقيقة، وطرائق استزراعها وعزلها وإحصائها، وتصنيفها مع ذكر بعض أنواعها.

وكذلك عُرض بإيجاز معلومات عن الطحالب الدقيقة، وطرائق استزراعها وعزلها وإحصائها وتصنيفها مع ذكر بعض أنواعها، وبعضاً من أنواع الجراثيم الزرقاء.

كما أُلحقَ دليلٌ للأوساط والصبغات والكواشف وقائمة بالمصطلحات العلمية الواردة.

إن منتهى ما أرجوه أخيراً أن أكون قد وفقتُ في عرض الموضوعات باللغة العربية التي يتفهمها طلابنا، والتي أرسى قواعدها آباؤنا وأجدادنا، وأن يحقق هذا الكتاب الهدف الذي أعد من أجله.

والله ولي التوفيق

دمشق ٢٠١٩ م

المؤلفة

الفصل الأول

توجيهات وإرشادات عامة

قبل البدء بتعريف ما يجب على الطالب اتباعه والالتزام به في مختبرات الأحياء الدقيقة يتوجب عليه معرفة أشياء كثيرة عن هذا المختبر، وتبدأ هذه الأمور بمعرفة مواصفات مختبر الأحياء الدقيقة.

مواصفات مختبر الأحياء الدقيقة

وضعت مواصفات دولية لمختبر الأحياء الدقيقة لكي يكون أكثر راحة وأماناً، وللإقلال – قدر الإمكان– من التلوث ومخاطره.

وعليه فقد قُسّم مختبر الأحياء الدقيقة إلى ثلاثة أقسام هي:

القسم الأول: لتجهيز أوساط الاستزراع، وجميع المواد الكيميائية الأخرى اللازمة للاختبارات مع تجهيز لوازم التجارب العملية وأدواتها كافة.

القسم الثاني: للقيام بعملية الزرع الطاهر وإجراء الاختبارات والحضن.

القسم الثالث: لتلف النفايات الميكروبية والتخلص منها على نحو سليم، وتنظيف الأدوات الزجاجية.

يبدأ تجهيز مختبر الأحياء الدقيقة عند تصميم بنائه، فهناك شروط يجب اتباعها في أثناء بناء مختبرات الأحياء الدقيقة، فهي تختلف عن باقي المختبرات بنواحٍ عديدة نذكر منها:

– يجب ألا يحتوي مختبر الأحياء الدقيقة على نوافذ مفتوحة على الوسط الخارجي، وإنما يتم تبادل الهواء بين المختبر والوسط الخارجي عن طريق فتحات مجهزة بمرشحات خاصة تسمح بمرور الهواء ولا تسمح بمرور الجراثيم من داخل المختبر إلى الخارج أو العكس.

– يُجهز مختبر الأحياء الدقيقة ببابين يفصل بينهما ممر طويل نوعاً ما، على أن لا يتم فتح البابان معاً، وإنما يفتح الباب الأول ليدخل منه العاملون في المختبر إلى الممر، ثم يُغلق هذا الباب ليستقر الهواء قليلاً في الممر، عندها يمكن فتح الباب الثاني، وذلك لكي لا تتشكل تيارات هوائية قوية وسريعة من شأنها أن تدخل الهواء من خارج المختبر إلى داخله أو العكس.

– يمكن أن يوضع عند الباب الأول ستائر هوائية لمنع دخول الحشرات إلى داخل المختبر.

– توضع المعاطف البيضاء عادةً في الممر المجهز بالأشعة فوق البنفسجية، حيث تسلط عليها الأشعة طوال الليل كي تعقم جيداً من أجل الاستعمال في اليوم التالي. ويجب تجنب التعرض للأشعة فوق البنفسجية. وعند الاضطرار لذلك يجب الوقاية باستعمال نظارات خاصة لحماية العينين.

– يجب الإقلال من الزوايا في المختبر حيث تُشَكل الزوايا بين الجدران والسقف والأرض على نحو دائري أملس مستمر، لأن تنظيف الزوايا وتعقيمها صعبٌ إذا ما قورن بتعقيم الأسطح المستمرة.

– يجب الإقلال قدر الإمكان من السطوح الخشنة التي من شأنها تجميع الجراثيم بداخلها، لذلك يمنع استعمال البلاط والبورسلين التي تترك بينها شقوق خشنة، ويستعاض عنها بطلاء المختبر كاملاً من حيث الجدران والسقف والأرضية بمادة ملساء ومقاومة للحموض والأسس والحرارة مثل مادة الإيبوكسي. ويجب أن تبطن جميع مصارف المياه في المختبر بمادة الستانلس ستيل الملساء الخالية من النتوءات أو الحفر أو الثقوب كي لا تكون بؤرة لنمو الجراثيم وتكاثرها.

– عدم وضع ستائر قماشية على الإطلاق داخل المختبر لأن مسام القماش تلتقط الغبار المليء بالجراثيم.

– يجب أن تكون صنابير المياه من النوع الذي يفتح آلياً عند وضع اليدين تحته ولا يفضل إطلاقاً استعمال صنابير المياه العادية التي تُفتح بقبضة اليد، كيلا تكون سبباً لانتقال الجراثيم من شخصٍ لآخر.

– يجب أن تفتح الأبواب كهربائياً وليس بقبضةٍ يدوية.

الملاحظات والتوصيات الواجب اتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة

بما أن العاملين في حقل الأحياء الدقيقة يتعرضون إلى خطر الميكروبات الضارة والممرضة؛ لذلك يجب اتباع الاحتياطات اللازمة في مراحل العمل كافة؛ فالنظافة والتعقيم وتنفيذ التجارب بدقة وعناية من الأمور الأساسية في عملي الأحياء الدقيقة، وإن أي إهمال في تهيئة مكان العمل والأدوات والمواد المستعملة للتجربة سيؤدي إلى نتائج خاطئة ويعرّض الطالب إلى خطر الإصابة بالجراثيم الممرضة.

هناك بعض الملاحظات والتوصيات التي يجب مراعاتها واتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة:

1 – ارتداء المعطف الأبيض قبل البدء بالعمل، ويجب تعقيمه فوراً في حال تلوثه بالجراثيم، كما يجب عدم إخراجه من المختبر إلّا في نهاية الفصل وبعد تعقيمه (إن أمكن ذلك).

2– تغطية شعر الرأس مع الأنف والفم بقناع قماشي، وارتداء القفازات.

3 – غسل اليدين قبل الخروج من المختبر بالماء والصابون أو بمحلول مطهر، والعناية بنظافة الأظافر وقصها باستمرار. على أن يراعى ما يأتي:

– عدم استعمال قطع الصابون الصلبة في تنظيف الأيدي في المختبر كي لا تكون عاملاً لنقل الجراثيم من شخص لآخر، ويستعاض عنها بالصابون السائل.

– عدم استعمال المناشف القماشية التي تستعمل لأكثر من مرة، ويستعاض عنها باستعمال مناشف ورقية تستعمل مرة واحدة فقط، وإذا كان لابد من استعمال المناشف القماشية فتستعمل مرة واحدة فقط، ولا يعاد استعمالها ثانيةً إلا بعد تعقيمها.

4 – عدم وضع الدفاتر والكتب على المنضدة.

5 – عدم التدخين والأكل داخل المختبر.

6 – عدم استعمال الماصات التي توضع في الفم لمص المعلقات الجرثومية، بل يجب استعمال أدوات سحب يدوية.

7 – تنظيف المكان قبل البدء بالعمل وبعد الانتهاء منه بالماء المضاف إليه قليلٌ من ماء جافيل، لأن النظافة والعقامة أمران ضروريان جداً لنجاح العمل الجرثومي.

ويجب أن يكون مكان العمل طاولةً ملساءَ مقاومةً للحموض والأسس والحرارة، ويفضل أن يكون لونها أسود؛ مما يسمح عادة بتمييز مستعمرات الجراثيم، ودراسة تفاعلات التراص على الصفيحة الزجاجية.

8 – تجنب تلوث اليدين أو المنضدة أو حوض الغسيل بالجراثيم وبالصبغات المستعملة لتلوين الجراثيم.

9 – عدم سكب الأوساط الغذائية أو رمي القطن وعيدان الثقاب في أحواض الغسيل، وإنما وضعها في سلة المهملات أو الأمكنة المعدة لذلك.

10 – تجنب كل ما من شأنه الإخلال بنظام المختبر ونظافته، والمحافظة عليه نظيفاً مرتباً باستمرار.

11 – إعلام المشرف على الجلسة العملية عند حدوث أي كسر بالأدوات أو عطل في الأجهزة أو تعرّض أحد لجرح ما أو حدوث تلوث.

12 – اتباع كل الشروط الصحية في التعقيم لتجنب تسرب الأحياء الدقيقة الخارجية إلى العناصر المراد دراستها جرثومياً أو إلى لأوساط الزرعية.

13 – قراءة التعليمات الخاصة بالتجربة بدقة قبل اتباع مراحل إجراء التجربة.

14 – عدم البدء بأيّ تجربة قبل التأكد من وجود المواد والتجهيزات والأدوات الضرورية لها كافة.

15 – عدم وضع إبَر التلقيح على المنضدة، ووضعها دائماً على حاملها الخاص أو إبقائها في اليد عند الاستعمال، والانتباه إلى تعقيمها قبل أي استعمال وبعده.

16 – الحذر عند استعمال الغاز، وعدم ترك الغاز مفتوحاً بلا داع.

17 – عدم إخراج المزارع الجرثومية والفطرية خارج المختبر على الإطلاق.

18 – عند ترقيم الأطباق والأنابيب تستعمل أقلام خاصة لذلك، أو تستعمل أوراق اللصق الخاصة مع الانتباه إلى عدم لصق هذه الأوراق باللسان، كما يجب تجنب وضع الأقلام في الفم خوفاً من الأخماج الجرثومية.

19 – تتم جميع مراحل التجربة في جو عقيم تماماً ضمن غرف زرع جرثومية خاصة.

20 – اربط أطباق بتري التي مازالت تحت التجربة بشريط لاصق واكتب عليها اسم المجموعة واسم التجربة واسم المقرر، وكذلك ضع الأنابيب الخاصة بمجموعتك في علبة خاصة، واكتب عليها اسم المجموعة واسم التجربة واسم المقرر، ثم ضع الأطباق والأنابيب في الحاضنات المعدّة لذلك.

21 – عند استعمال المجهر بالتجارب، وللحفاظ عليه وعلى نظافته وخصوصاً العدسات، يجب اتباع التعليمات الآتية:

- لا تلمس أبداً العدسات باليد، وإذا كانت متسخة امسحها برفق باستعمال الورق الناعم الخاص لذلك.

- لا تترك شيئاً على المجهر في حال عدم استعماله، واحفظ المجهر بعيداً عن الغبار والسوائل، واتركه دائماً على العدسة ذات التكبير الأقل.

-أ زل زيت الأرز بمسحه بكمية قليلة من الزيلول (غول الخشب) Xylol مباشرة عند انتهاء استعمالك للعدسة الغاطسة؛ لأن تجمّد زيت الأرز على عدسة المجهر يقتضي استعمال المحلات القوية مثل الزيلول بغزارة لحلّه. ويمكن أن يؤدي الاستعمال الكثيف والمتكرر لهذه المادة إلى حلّ المادة اللاصقة للعدسات.

-لا تحرك المجهر في أثناء استعمالك لزيت الأرز؛ لأن سقوطه على الأجزاء الميكانيكية أو المكثف سيوقعك في أزمة تنظيفها الصعب، كما أن تركها دون تنظيف يعوّق حركة المجهر مستقبلاً بسبب الزيت المتجمد وذرّات الغبار التي تلتصق به.

22 – سَجّل ملاحظاتك مباشرة فور القيام بالتجارب وقدمها بتقرير للأستاذ المشرف وفق النقاط الآتية والنموذج المرفق:

الاسم : .....

التاريخ : .....

الفئة : .....

اسم التجربة : .....

الهدف من التجربة : .....

ملخص طريقة العمل :.....

النتائج : .....

المناقشة والخلاصة : .....

نموذج كتابة التقارير في عملي الجراثيم

- عنوان التجربة ورقمها.
- غرض التجربة أو هدفها.
- طريقة العمل.
- النتيجة التي تكون مرتبة في جدول أو موضحة برسوم تخطيطية.
- المناقشة والخلاصة.

ويُفضل عند رسم الجراثيم عمل دوائر قطرها نحو 5 سم، ثم رسم الخلايا الجرثومية التي ترى تحت المجهر في هذه الدوائر.

تنظيف الأدوات الزجاجية المستعملة:

تزال جميع العلامات والكتابة المدونة على الأدوات الزجاجية، ثم توضع الأدوات الزجاجية المحتوية على المزارع الجرثومية أو الفطرية في الصاد الموصد Autoclave (المعقم) عند درجة حرارة 121°م وضغط 15 ليبرة/إنش^2 مدة 15 – 20 دقيقة، لقتل الأحياء الدقيقة وإسالة الوسط الغذائي الصلب، ثم تؤخذ وهي ساخنة حيث تفرغ من محتواها وتغسل.

ملاحظة:

إذا أريد استعمال الأدوات الزجاجية في اختبارات حساسة، يجب غسلها بالماء والصابون أولاً، ثم تنظيفها جيداً بمحلول ماء جافيل 6% ، وبعدها تنقل إلى حمض كلور الماء 1%، ثم يزال أثر الحمض بوضعها في الماء المقطر، ثم تجفف وتصبح جاهزة للاستعمال.

جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الثاني

الأدوات والتجهيزات المستعملة في مختبرات الأحياء الدقيقة

لا بد أن يحتوي أي مختبر للأحياء الدقيقة على الأدوات والتجهيزات الأساسية اللازمة لإجراء الاختبارات المختلفة والتعقيم والحضن والحفظ وغيرها.

الأدوات المستعملة في مختبر الأحياء الدقيقة

هناك مجموعة من الأدوات الأساسية في مختبر الأحياء الدقيقة وهي:

1- عروة البلاتين (إبرة الزرع) Platinum loop

يُستعمل لأخذ العينات المختلفة وزرع الأحياء الدقيقة ونقلها، وهو عبارة عن قضيب معدني ينتهي بسلك من البلاتين الذي يُحمى بسرعة ويبرد بسرعة، أو من معدن آخر لا يتأكسد عند تسخينه (مثال التنغستين)، ويكون لسلك البلاتين أشكال متعددة منها المستقيم كالإبرة Inoculation needles يستعمل للزرع بالوخز وآخر حلقي Inoculation loop needles ذو عقدة لأخذ المواد اللزجة (الشكل ١).

2- ممص باستور pipette Pasteur

هو أنبوب شعري يحضّر عادةً من أنابيب زجاجية عادية قابل للتعقيم ويستعمل عدة مرات، أو قد يكون من البلاستِك المعقم ويستعمل مرة واحدة.

3- مسحة قطنية معقمة Sterile swab

هي عود خشبي يُلف أحد نهايتيه بقطعة من القطن، توضع في أنابيب محكمة الإغلاق وتعقم لاستعمالها عند الحاجة إليها (الشكل ٢).

وتستعمل هذه المسحات لأخذ نماذج من اللوزتين والبلعوم والأغشية المخاطية. ومسحات الجدران والمنضدة وغيرها.

الشكل ١ عروة البلاتين

4- ملهب بنزن Bunsen burner

يُستعمل لتعقيم إبر الزرع وغيرها من الأدوات الزجاجية والمعدنية الصغيرة كالمشارط وفوهات الأنابيب وغيرها.

5- زجاجيات مختلفة

مثل الأنابيب والحوجلات والدوارق المخروطية والعيارية والماصات والسباتيولات الزجاجية والمخابير المدرجة والسحاحات والبواتق وأطباق بيتري وأنابيب الاختبار.

الشكل ٢ المسحة القطنية

الأجهزة المستعملة في مختبر الأحياء الدقيقة

1- المعقم أو الصاد الموصد (الأوتوغلاف) Autoclave

يستعمل للتعقيم بالبخار تحت الضغط، وهي طريقة من طرائق التعقيم بالحرارة الرطبة، (الشكل ٣) أوتوغلاف يضبط يدوياً (الشكل ٤) أوتوغلاف يضبط أوتوماتيكياً.

هو جهاز مكون من وعاء أسطواني الشكل مصنوع من معدن مقاوم يستر بغطاء، فيه ثلاث فتحات: إحداها قابلة للسد والفتح لخروج الهواء والبخار، نسميها منفذ البخار. والفتحة الثانية متصلة بمقياس للضغط والحرارة، والثالثة سدّادة أمان مجهزة بنابض قوته أقل من تحمل الوعاء لاتقاء خطر الانفجار. يوجد داخل الجهاز سلّة معدنية لوضع المواد المراد تعقيمها، ويسخن هذا الجهاز بالكهرباء أو بالغاز.

تُعقم فيه جميع الأوساط الغذائية التي لا تتخرب بدرجة الحرارة 121°م وكذلك جميع المواد الزجاجية والمعدنية والمطاطية والورقية المتحملة للحرارة، ويُعد حالياً من أسرع وسائل التعقيم وأسهلها.

الشكل ٣ جهاز الصاد الموصد (أوتوغلاف) يضبط يدوياً

الشكل ٤ جهاز الصاد الموصد(أوتوغلاف) المضبوط أوتوماتيكيا

وتجدر الإشارة إلى وجود بعض المواد التي لا ينصح بتعقيمها بالمعقم، كما في المواد التي تتأثر بالحرارة المرتفعة، أو التي لا تمتزج بالماء مثل الدهون والزيوت.

2- الأفران Ovens

يستعمل للتعقيم بالهواء الجاف، وهو غرفة معدنية معزولة ذات جدار مضاعف مع ميزان حرارة، تضبط حرارته بمنظم حراري (ترموستات) لتبقى ثابتة على درجة حرارة معينة، ويتعلق زمن التعقيم بدرجة الحرارة المستعملة للتعقيم، ويجهز الفرن بمؤقت زمني، يوقف الجهاز عن العمل عند انتهاء الزمن المحدد. وتنظم الأفران على أن يكون توزع الحرارة متجانساً فيها وثابتاً في جميع أرجاء الفرن. لتعقم فيه جميع الأدوات الزجاجية والمعدنية من ملاقط وأطباق بتري وماصات وغيرها، بعد لفّها بالورق المقاوم للحرارة ووضعها في علب معدنية خاصة تسمى علب التعقيم، حيث تحفظ العلب مغلقة بعد التعقيم لوقت الاستعمال.

ويجب سدّ الأنابيب والدوارق والماصات بسدادات قطنية قبل تعقيمها، كما يجب الانتباه إلى عدم فتح علب التعقيم قبل أن تبرد تماماً تحاشياً للتلوث بالجراثيم الخارجية التي تدخل مع دخول الهواء الخارجي.

3- الحاضنات Incubators

هي غرف معدنية تستعمل لحضن الأحياء الدقيقة بعد زرعها على الأوساط الزرعية، تشبه أفران الهواء الساخن لكنها مخصصة للاستعمال بدرجات حرارة أخفض، ويجب أن يكون الارتياب بدرجة الحرارة ضئيلاً جداً. تجهز الحاضنة أيضاً بفتحات تهوية خلفية تضبط حسب هدف التجربة.

تنظم درجة حرارتها بمنظم حراري، يتم اختيار درجة الحرارة المناسبة عادة حسب التجربة والأنواع الجرثومية المراد استزراعها.

توجد اليوم تصاميم جديدة لحاضنات روعيَ في بعضها ضبط نسبة ثنائي أكسيد الكربون والرطوبة آلياً داخل الحاضنة، فقد أصبح معروفاً أهمية حضن بعض الأنواع الجرثومية الطبية خصوصاً في جو من ثنائي أكسيد الكربون يتراوح بين 5-8 %.

وزوّد بعضها الآخر بجهاز رجّاج Shaker يعمل على خلط ومجانسة وتهوية المزارع الجرثومية النامية على الأوساط السائلة التي تؤثر درجة التهوية في إنتاجيتها من المواد الاستقلابية المختلفة (الشكل ٥).

الشكل ٥ حاضنة مزودة بجهاز هزاز Shaker

4- غرفة الزرع الجرثومي (اللامنير) Laminar flow

ويطلق عليها أيضاً اسم غرفة العزل الجرثومي الآمنة Microbiological Safety cabinet

وهي غرفة زجاجية مجهزة بمرشح تتراوح ثقوبه بين0.2- 0.3 ميكرون، ويجب أن يكون من الصف آ (١٠٠)، (100) class A، يمرُ الهواء عبر المرشح ليخرج عقيماً وخالياً من جميع الأحياء الدقيقة (الشكل ٦). يوجد نموذجان لغرفة

الزرع، وذلك حسب مكان المرشح في الجهاز وحركة الهواء داخل الجهاز، هما النموذج العمودي والنموذج الأفقي.

يستعمل النموذج العمودي للزرع الجرثومي، أما النموذج الأفقي فلا يستعمل للزرع الجرثومي إطلاقاً؛ وإنما يستعمل لأغراض أخرى.

كما يمكن أن تُجهز هذه الغرفة بجهاز أشعة فوق بنفسجية ومصباح لهب كحولي أو يعمل على الغاز لتعقيم إبر الزرع قبل الاستعمال وبعده، إضافة إلى تجهيزها بمخلية هواء (Vaccium) من أجل إجراء الاختبارات التي تحتاج إلى عمليات ترشيح.

الشكل ٦ غرفة زرع جرثومي (يسار)

رسم يوضح أجزاء غرفة الزرع الجرثومي وحركة الهواء بداخله (يمين)

5- ميزان حساس Micro balance

يُستخدم عادة لوزن العينات ومكونات الأوساط، ويفضل عادة الوزن تحت غرفة الزرع إن أمكن ذلك (منعاً للتلوث الجانبي ولاسيما للأوساط التي لا تعقم).

ولتلافي تأثير تيارات الهواء الجوي في تقدير أوزان الأجسام والمواد المختلفة، فقد تم صنع الميزان الكهربائي ذي الكفة الواحدة في صندوق، وفيه تبين شاشة

العرض الوزن مباشرة، ويفضل أن تكون دقة الميزان لأقرب رابع رقم عشري على الأقل (الشكل ٧).

الشكل ٧ ميزان حساس

6- عداد المستعمرات الجرثومية Bacterial colony counter

يستعمل لتسهيل عملية عد المستعمرات الجرثومية، وله عدة أشكال، منها اليدوي والإلكتروني (الشكل ٨) :

الشكل ٨ نماذج من عدادات الجراثيم

7- حمام مائي Water -bath

تضبط حرارته بمنظم حراري دقيق، يستعمل لتحضير أوساط الاستزراع الصلبة وإسالتها وتحضير محاليل بعض المواد والملونات كما يستعمل لإجراء

بعض الاختبارات الخاصة التي يجب أن تجرى في درجات حرارة معينة (الشكل ٩).

الشكل ٩ الحمام المائي

8- المثفلة Centrifuge

يسمى أيضاً جهاز الطرد المركزي ويستعمل لفصل المواد المعلقة في محاليلها والأحياء الدقيقة العالقة في أوساط استزراعها.

9- الرجّاج Shaker

يُستعمل في عمليات رجّ المزارع الجرثومية السائلة ومجانستها. ولاسيما تلك التي تحتاج إلى تهوية مستمرة، وكثيراً ما يزود الرّجاج بمفاتيح للتحكم في عدد الهزات المطلوبة في الدقيقة الواحدة (الشكل ١٠).

10- المطيافية الضوئية Spectrophotometer

يُستعمل مقياس الطيف الضوئي لتقدير النمو الكمي للجراثيم من خلال معرفة كثافتها الخلوية، كما يحدد امتصاصية الأصبغة والمحاليل التي تختلف في قدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية UV والأشعة المرئية والأشعة القريبة من تحت الحمراء Infrared (IR).

شكل ١٠ جهاز الرج Shaker

11- مقياس الرقم الهيدروجيني PH Meter

يُستعمل لتنظيم وتحديد رقم حموضة الأوساط المغذية والمحاليل المختلفة، ولقراءة نتائج الاختبارات، وتتباين أجهزة تقدير الرقم الهيدروجيني في تصميماتها لكن هذه الأجهزة تحتاج لمعايرة مستمرة بالمحاليل المعيارية المرافقة.

12- جهاز تقطير المياه

يستعمل للحصول على الماء المقطّر distieled water على أن يكون الماء المقطّر خالياً من عنصر النحاس الذي يُعدُّ من العوامل المثبطة لنمو الجراثيم.

13- جهاز لنزع الشوارد من الماء

يُستعمل لنزع الشوارد من الماء المراد استعماله في تحضير أوساط الاستزراع.

14- مخلية هواء (Vaccum)

تربط هذه المخلية على أجهزة الترشيح، لتسريع عملية الترشيح (الشكل ١١).

- وهناك أيضاً السخانات الكهربائية Electrical Hot plates والمقلبات الكهربائية Electrical Stirrers التي تستعمل في خلط مكونات المحاليل والأوساط الغذائية. والمحركات المغناطيسية Stirrers (الشكل ١٢).

شكل ١١ مخلية هواء (فاكيوم)

شكل ١٢ المحركات المغناطيسية Stirrers

يجب على الفني القائم على مختبر الأحياء الدقيقة متابعة هذه الأجهزة ومعايرتها باستمرار للتأكد من صلاحيتها للعمل لكي يضمن نتائج جيدة.

15- المجهر Microscope

إن استعمال المجهر في دراسة الشكل الظاهري للجراثيم أمر ضروري ومهم نظراً إلى كون الجراثيم صغيرة الحجم؛ إذ لا يمكن رؤيتها وفحصها بالعين المجردة، فهو الذي يساعد على تكبيرها وتمييزها، وهنالك عدة أنواع من

المجاهر، تختلف باختلاف تركيبها والغرض من استخدامها، ومن هذه المجاهر: نذكر:

المجهر الضوئي (Light Microscope (LM

يُستعمل لدراسة الأحياء الدقيقة غير المرئية بالعين المجردة، وتجدر الإشارة إلى نقطة مهمة في تصميم المجاهر، وهي أن العامل المهم ليس فقط زيادة قوة التكبير Magnification وإنما هو قوة التمييز أو التوضيح Resolution Power (R.P)، وتعرف بأنها أصغر مسافة بين نقطتين حيث تبدو كل نقطة منها منفصلة عن الأخرى بوضوح، وهي تتناسب عكساً مع طول موجة الضوء المستعمل λ، وطرداً مع الفتحة العددية للعدسة الجسمية (N-A) Numerical Aperture، التي تعبّر عن النسبة بين قطر العدسة وبُعدها البؤري. وتعدّ الفتحة العددية الجسمية للمجهر الضوئي محدودة، فهي للعدسات الجافة أقل من واحد وللعدسات الغاطسة في الزيت أكثر من واحد (1.2-1.4). ويمكن حساب قوة التمييز R.P بعلاقة آبي Abbe :

$$R.P = 0.16 \lambda / n \sin \theta$$

حيث: λ = طول موجة الضوء المستعمل.

n = قرينة انكسار الوسط بين العدسة الجسمية والجسم المدروس، وهي تساوي 1 في حالة الهواء و 1.53 عند استعمال زيت الأرز Cedar – Wood Oil مع العدسة الغاطسة.

Sin θ = جيب زاوية انعكاس الضوء على المحضر.

وعليه، يمكن تحسين قوة التمييز بتقليل طول موجة الضوء المستعمل (كما هي الحال في مجهر الأشعة فوق البنفسجية) أو بزيادة قرينة انكسار الوسط أو زيادة انعكاس الضوء على المحضر. وإن استعمال زيت الأرز يخفض هذه القوة

حتى 0.24 ميكرومتر، بينما يمكن خفضها حتى 0.22 ميكرومتر باستعمال أحادي بروم النفتالين.

وهناك عدة أنواع من المجاهر الضوئية تتشابه في استعمالها لأشعة الضوء العادي أو أحد مكوناته في إضاءة الجسم المفحوص، وتختلف في قوة تكبيرها والأغراض التي تستعمل من أجلها، وهي:

1- **المجهر البسيط Simple Microscope:** يتكون من مجموعة واحدة من العدسات وظيفتها تكبير الأجسام المفحوصة.

2- **المجهر المركب Compound Microscope** (الشكل ١٣): هو المجهر المستعمل، وقد تعرف عليه الطالب في أكثر من مقرر فلا داعٍ للإسهاب في الشرح عنه.

الشكل ١٣ مسار الأشعة الضوئية في المجهر الضوئي المركب

وإن أكثر ما يستعمل للدراسة الجرثومية العدسة الغاطسة ذات التكبير 90-100، ولكن، المهم معرفة أن المشكلة ليست مشكلة تكبير بقدر ماهي مقدرة

المجهر على تمييز الأجزاء الدقيقة المتجاورة بعضها من بعضٍ أو ما يسمى بقوة التمييز (القوة الفاصلة)، حيث إن زيادة التكبير تؤدي إلى ظهور صورة غير واضحة المعالم؛ لذلك عند استعمال العدسة ذات التكبير 90 أو 100 التي تدعى بالعدسة الغاطسة أو الزيتية، لا بد من غطس العدسة بزيت الأرز النقي الذي يملك معامل انكسار للضوء يساوي 1.53، وهو معامل انكسار الضوء والزجاج نفسه. مما يؤدي إلى إيقاف بعثرة الضوء ومنع انكساره نتيجة نفاذه في وسطين متساويين في الكثافة (الزيت والصفيحة الزجاجية) عكس ما يحدث إذا ما مرّ الضوء في الزجاج ذي قرينة الانكسار 1.53 إلى الهواء ذي قرينة الانكسار 1؛ مما يؤدي إلى انكساره وتشتيته وعدم وضوح الرؤية (الشكل ١٤).

ولكن يجب ملاحظة ومراعاة الآتي عند استعمال زيت الأرز:

1- يجب أن يكون الزيت خالياً من الشوائب.

2- يجب تنظيف العدسة الغاطسة بمادة الزيلول بعد استعمال زيت الأرز مباشرة، وكذلك جميع العدسات إذا ما تلوثت بزيت الأرز.

3- عند استعمال العدسة الغاطسة نضع المكثف إلى أقصى علوه ونترك حاجز المكثف مفتوحاً.

الشكل ١٤ الفرق بين مسار الضوء باستعمال زيت الأرز من دونه

3 – مجهر الأشعة فوق البنفسجية Itra Violet Light Microscope:

يستخدم في الدراسات الميكروبيولوجية ولاسيما الجراثيم، ويختلف عن المجهر العادي باستعمال الأشعة فوق البنفسجية UV بدلاً من الضوء المرئي، وبالمقابل يجب أن تكون عدساته من الكوارتز لتستطيع تأمين نفاذية الأشعة فوق البنفسجية ومرورها، وتصل قوة التمييز فيه حتى 1000 °A.

4– المجهر الفلورسيني Fluorescence Microscope: يفيد هذا المجهر بدراسة تفاعلات المناعة والأجسام المضادة Antibodies الموسومة أو المضاف إليها الأصبغة الفلورسينية مع مولدات الضد Antigens الموجودة على الأحياء الدقيقة، إذ تتحد الأجسام المضادة والأصبغة الفلورسينية اتحاداً كيميائياً، فتشكل جزيئات بروتينية فلورسينية كبيرة، تقوم – بدورها– بالاتحاد مع مولدات الضد فتبدو الأحياء الدقيقة المصبوغة بالفلورسين متوهجة عند فحصها بمجهر الأشعة فوق البنفسجية (الفلورسيني). تسمى هذه الظاهرة بالفلورة (التألق) Fluorescence ويسمى المجهر بالمجهر الفلورسيني.

والمواد الفلورسينية (الأصبغة الفلورسينية) Fluorescent هي مواد كيميائية تتميز بقدرتها على امتصاص موجات الأشعة فوق البنفسجية وإظهارها على هيئة موجات مرئية. ولذلك تبدي هذه المواد لوناً واحداً عند تعرضها للضوء العادي، بينما تعطي ألواناً متعددة عندما تتعرض للأشعة فوق البنفسجية.

5 – مجهر الحقل المظلم Dark-Field Microscope: يتميز هذا المجهر باحتوائه على مكثف من نوع خاص يحول الضوء إلى مخروط أجوف يميل بزاوية حادة بحيث تتفرق الأشعة بعد اختراقها المحضر، فلا تدخل إلى العدسة الجسمية مباشرة؛ مما يظهر حقل الرؤية مظلماً، ولكن عند وجود الأحياء الدقيقة أو الجراثيم في الشريحة الزجاجية فإنها تعكس بعض أشعة الضوء داخل العدسة الجسمية، وبذلك نرى الأجسام مضيئة في الحقل المجهري المظلم، وهنا لابد أن

نؤكد على النظافة التامة عند تحضير العينات، واستعمال صفائح زجاجية خالية من الخدوش كي لا تكون سبباً في انكسار الضوء. يُستعمل هذا المجهر في دراسة الخلايا الحية غير المصبوغة ولاسيما لرؤية الحركة.

6- مجهر الأطوار المتباينة Phase Contrast Microscope : يرتكز صنع هذا المجهر على ظاهرتين أساسيتين هما:

- ظاهرة انحراف الضوء نتيجة اختلاف قرائن الانكسار بين المكونات الخلوية المختلفة.
- يؤخر الضوء الجانبي أو يقدم ¼ الموجة الضوئية على ما هي عليه في المركز.

وبهذا فهو يحول الاختلاف الطبيعي للمكونات إلى اختلاف أقوى وأوضح، حيث يمكننا رؤية هذه المكونات الخلوية دون الحاجة إلى صبغها أو قتلها من جهة، كما أنه ينتج قوة تمييز أفضل للتفاصيل الدقيقة من جهة أخرى. يستعمل هذا النوع من المجاهر في الدراسات الحيوية النظرية والتطبيقية ولاسيما فحص الخلايا الحية والنُسج غير المصبوغة.

7- المجاهر الإلكترونية Electron Microscopes : تكون المجاهر الإلكترونية بعدة أشكال:

1 – المجهر الإلكتروني الناقل T.E.M. Transmission Electron Microscope.

2 – المجهر الإلكتروني الماسح S.E.M. Scanning Electron Microscope

الفصل الثالث

التـعقيم
Sterilization

تعريف التعقيم:

هو وقف نشاط جميع أشكال الحياة الميكروبية أو إبادتها، أو هو إتلاف كل الأحياء الدقيقة الممرضة وغير الممرضة من جراثيم وأبواغ وفطريات وطفيليات وفيروسات Virus التي يمكن أن تكون في الأواني والأجهزة والأوساط الزرعية المستعملة في دراسة علم الأحياء الدقيقة.

وبما أن كل ما يحيط بنا من هواء وتراب وماء غنيٌ بالجراثيم المختلفة وأبواغها وغيرها من الأحياء الدقيقة، لذلك يُعدّ التعقيم من أهم الأسس التي ترتكز عليها جميع العمليات الميكروبيولوجية.

ويجب التفريق بين التعقيم والتطهير Disinfection الذي يعني تقليل العدد الكلي للجراثيم الملوثة بقتل الخلايا الإعاشية دون قتل أبواغها، علماً بأننا غالباً ما نستعمل التعبيرين للغرض نفسه ولاسيما عند وجود جراثيم غير متبوغة حيث يتساوى المعنيان. وقد عرّف بعضهم عملية التطهير بأنها قتل الجراثيم الممرضة.

ومن غير الممكن الشروع بأي عمل يتعلق بزرع الجراثيم وعزلها دون التعرف مسبقاً على الطرائق التي تسمح بتجريد أوساط الزرع والسوائل والأدوات المستعملة من الأحياء الدقيقة العالقة بها؛ فالتعقيم هو أساس التقنية لعلم الأحياء الدقيقة.

آلية التعقيم: تختلف آلية التعقيم باختلاف الطريقة المستعملة، ولكنها تؤدي في النهاية إلى تثبيط أحد الإنزيمات أو كلها الموجودة في الخلية أو قتلها؛ مما يؤدي

إلى وقف عمليات الاستقلاب الخلوية، ووقف مقدرتها على النمو والتكاثر، ويجب أخذ الآتي في الحسبان عند التعقيم:

- **معدل موت الخلايا الجرثومية:** عندما تتعرض المستعمرات الجرثومية للتعقيم فإنها لا تموت كلها في آن معاً؛ بل يحدث ذلك في أوقاتٍ متقطعة؛ حيث إنَّ عدد الخلايا الميتة يتناسب مع زمن التعقيم أو شدته. مما يحتم علينا مضاعفة الزمن أو الطاقة الحرارية أو شدة الإشعاع عند إبادة ٩٩.٩٠% من الخلايا الجرثومية بدلاً من ٩٩% كما تلزم المضاعفة مرة أخرى عند زيادة الإبادة إلى ٩٩.٩٩% وهكذا. وكثيراً ما نعتمد على قواعد معينة وثابتة للحصول على تعقيم جيد.

- **مقاومة الجراثيم:** يختلف رد فعل الجراثيم للتعقيم باختلاف النوع الجرثومي، وعموماً فإن الجراثيم الموجودة في أوساطها الطبيعية تقاوم التعقيم أكثر من تلك الموجودة في الأوساط الصنعية. وكذلك فإن الأبواغ الجرثومية تظهر مقاومة أكبر من الخلايا الإعاشية.

- **ضبط عملية التعقيم (اختبار كفاءة عملية التعقيم):** ويتم ذلك للتأكد من إتمام عملية التعقيم، وعادة تضبط عملية التعقيم (خاصة في الصاد الموصد) بإحدى الطرائق الآتية:

1- **الاختبارات الحيوية:** تستعمل فيها الأوساط الغذائية لتعداد الجراثيم المقاومة للتعقيم. أو تستعمل أبواغ جراثيم مقاومة توضع مع المواد المراد تعقيمها، ثم يتم التأكد من قتلها أو عدمه.

2- **المزدوجات الحرارية:** طريقة سهلة ومباشرة، حيث توضع الأقطاب بنقاط مختلفة داخل الوسط المراد تعقيمه وتسجيل درجة الحرارة.

3- **الأنابيب الشاهدة:** تستعمل في حالة التعقيم بالبخار حيث توضع في أنابيب صغيرة مغلقة مادة كيميائية ذات درجة انصهار معروفة وتمزج معها أحياناً ملونات معينة، فعندما ترتفع درجة الحرارة تنصهر المادة، وتنتشر عبر الملون وتلون الأنابيب. من المواد المستعملة Antipyrine الذي ينصهر عند الدرجة 114° م وحمض البنزوئيك Benzoic acid الذي ينصهر عند الدرجة 121° م، وتدل الأنابيب السابقة على الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة، ولكنها لا تعطي أيَ فكرة عن المدة التي تبقى عليها.

4- **المشعرات اللونية:** تتميز بعض المواد بقدرتها على إعطاء لون رمادي ثم أسود، تبعاً لتغيرات درجة الحرارة أو تغير زمن التعقيم. وكثيراً ما تضاف لهذه المواد قصاصات ورقية بيضاء تساعد على كشف تغير اللون. وتعد أملاح الرصاص (كربونات الرصاص) وأملاح الليتيوم (كبريتات أو كربونات الليتيوم) من أكثر المواد المستعملة.

طرائق التعقيم: تضم الطرائق الشائعة للتعقيم استعمال الحرارة الجافة أو الرطبة والترشيح والإشعاعات وأحياناً استعمال بعض المواد الكيميائية، ولاسيما الغازية للتعقيم على البارد، ولكل من هذه الطرق استخداماتها.

أولاً: التعقيم بالحرارة

1- التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat

آليتها : تقوم الحرارة الجافة بأكسدة المركبات الكيميائية للخلية، وكثيراً ما تستعمل

إحدى الطريقتين الآتيتين:

أ – **التعقيم باللهب:** يمكن أن نستعمل اللهب (الغاز – المصباح الكحولي) للتعقيم الآني أو المؤقت بعمليتي الإحماء والتلهيب.

الإحماء : يستعمل لتعقيم الإبر البلاتينية وبعض الأدوات المعدنية التي لا تتغير إذا سخنت حتى الاحمرار والتشهب، ولا تستعمل الأداة المعقّمه إلا بعد أن تبرد ولمرة واحدة فقط، ويجب إعادة تعقيمها قبل كل استعمال.

التلهيب: بتعريض الأشياء الملساء كأطراف الممص والقضبان الزجاجية وفوهات الأنابيب والقوارير للّهب. بإمرارها 3-4 مرات بحركة ليست بالسريعة أو البطيئة مع تدويرها. أما المشارط المعدنية فتعقّم بغمسها في الكحول أولاً، ثم تعريضها إلى اللهب.

ويقسم اللهب إلى ثلاثة أقسام:

- القسم السفلي: تكون درجة حرارته منخفضة نوعاً ما، ويستعمل عادة لتعقيم الصفائح الزجاجية وفي حال تثبيت اللطخة الجرثومية (الغشاء الجرثومي).
- القسم المتوسط: تكون حرارته أكثر ارتفاعاً ويستعمل لتعقيم إبر التلقيح وفوهات الأنابيب والحوجلات والسدادات.
- القسم العلوي: تكون درجة حرارته منخفضة نوعاً ما بالإضافة إلى وجود هباب الفحم في حال عدم الاحتراق الكامل، لذلك نتجنبه في عمليات تحضير اللطخة الجرثومية خشية التأثير في نظافة الصفيحة الزجاجية وعدم وضوح الرؤية.

ب- **التعقيم في أفران الهواء الساخن**: يستند مبدأ هذه الطريقة إلى رفع درجة حرارة الهواء الموجود داخل الأفران، وضبط هذه الدرجة بالمنظم الحراري Thermostat على أن تبقى ثابتة طيلة مدة التعقيم. أما الحرارة الأكثر استخداماً فهي من 160°م حتى 190°م. ويبين الجدول ١ الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الجافة بمختلف درجات الحرارة .

تعقّم في هذه الأفران جميع الأدوات المعدنية والزجاجية بعد لفها بورق يتحمل درجات الحرارة المرتفعة؛ لمنع تلوثها، بعد إخراجها من الفرن.

الجدول 1 -الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الجافة في درجات حرارة مختلفة.

درجة الحرارة المئوية	الزمن بالدقيقة
140	180
150	150
160	120
170	60
180	30

2- التعقيم بالحرارة الرطبة Water heat

آليتها : تعمل الحرارة الرطبة على تخثر سريع لبروتينات الخلايا، ويمكن إجراء التعقيم بالحرارة الرطبة بعدة طرائق:

أ – **التعقيم بالبخار تحت الضغط:** يعتمد مبدأ هذه الطريقة على التسخين في جو مشبع ببخار الماء، وتحت ضغط مناسب، ومن المعروف أن درجة غليان الماء ترتفع كلما ارتفع الضغط فوق سطحه؛ فالماء يغلي عند الدرجة 100°م تحت الضغط الجوي العادي (1 جو) أو صفر ليبرة/إنش²، وهناك تناسب طردي بين زيادة الضغط وارتفاع درجة حرارة غليان الماء، كما هو مبين بالجدول ٢.

وهذه الطريقة من أفضل طرائق التعقيم وأكثرها استعمالاً. كما أنها تمتاز بميزتين: الأولى التسخين السريع، والثانية: وفرة الرطوبة، مِمَّا يسهّل عملية تخثر البروتينات الخلوية بزمن قصير. ويبين الجدول ٣ الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الرطبة بمختلف درجات الحرارة.

ويستعمل لهذا الغرض الأوتوكلاف (المعقم) (راجع فقرة الأدوات والتجهيزات الخاصة بالمختبرات الجرثومية)، أما طريقة استعمال الجهاز فهي كالآتي:

جدول رقم /2/ الزمن المطلوب والضغط المطبق لدرجات الحرارة الأكثر استخداما في طريقة التعقيم بالحرارة الرطبة

ضغط بخار الماء ليبرة/ انش^2	درجة الحرارة المئوية	ضغط بخار الماء ليبرة/ انش^2	درجة الحرارة المئوية
0	°100	12	°118
1	°102.3	13	°119.1
3	°105.7	14	°120.2
5	°108.8	15	°121.3
7	°111.7	16	°122.4
9	°114.3	17	°123.3
10	°115.6	18	°124.3
11	°116.8	20	°126.2

جدول رقم /3/ يبين الزمن المناسب الموافق لدرجة الحرارة المستخدمة للتعقيم بالحرارة الرطبة مع الضغط المطبق.

درجة الحرارة المئوية	الزمن بالدقيقة	الضغط (ليبرة/ انش^2)
°121	15	15
°126	10	20
°134	5	30

توضع المواد المراد تعقيمها في السلة المعدنية المرافقة بالجهاز، وتوضع كمية كافية من الماء في الجهاز حسب التعليمات الواردة في دليل التشغيل، ثم نغلق

الغطاء بإحكام، ونفتح منفذ البخار، ونسخن الجهاز حتى غليان الماء بداخله، فيخرج الهواء من منفذ البخار متقطعاً، ثم ممزوجاً مع البخار، ثم يخرج البخار صافياً على هيئة صفارة متواصلة، عندها نغلق منفذ البخار، فتبدأ إبرة مقياس الضغط بالحركة؛ أي يبدأ الضغط بالارتفاع، وترتفع معه درجة الحرارة. وعند وصول مقياس الضغط للدرجة المطلوبة يخفف منبع الحرارة، ويضبط الجهاز على تلك الدرجة من الحرارة مدة كافية، والمدة الكافية للتعقيم عادةً هي 15 - 20 دقيقة بدرجة 121°م تحت الضغط 15 ليبره/إنش^2 أو ما يساوي 2 بار. ولكن ينبغي زيادة هذا الزمن في حال تعقيم حجم كبير من الأوساط أو أوساط ذات حمولة جرثومية كبيرة، أو أحياناً يمكن زيادة درجة الحرارة.

بعدها نطفئ الجهاز، وننتظر عودة إبرة مقياس الضغط إلى الصفر، عندها فقط نقوم بفتح الجهاز وإخراج المواد.

- عند التعقيم بالمعقمة (الأوتوكلاف) ينبغي ملاحظة الآتي:

1- يكون بدء التعقيم عند الوصول للحرارة المطلوبة 121°م ويجب أن تبقى هذه الحرارة ثابتة خلال مدة التعقيم.

2- لا يُبدأ برفع الضغط في الأوتوكلاف إلا بعد طرد الهواء كلياً، ووجود الهواء داخل المعقمة يؤثر في عملية التعقيم، إذ إن بقاء الهواء داخل الجهاز من شأنه أن يخفّض درجة الحرارة المسجلة مقارنة بالضغط المشار إليه في الجهاز. درجة الحرارة العالية للبخار المضغوط هي التي تقتل الخلايا. بالإضافة إلى أنّه عندما تتناقص نسبة الرطوبة تزداد مقاومة الجراثيم لدرجات الحرارة العالية بوضوح.

3- بعد الانتهاء من التعقيم ينتظر دوماً انخفاض حرارة الجهاز حتى تصبح مساوية لحرارة المختبر قبل إخراج الأدوات خشية تصدعها نتيجة فارق الحرارة أو فارق الضغط.

– تستعمل هذه الطريقة لتعقيم الأوساط الزرعية التي لا تتخرب بدرجة الحرارة 121°م، وإنما تتخرب بالدرجات الأعلى من الحرارة. كذلك تعقم فيه جميع المواد الزجاجية والمعدنية والورقية والمواد الغذائية التي لا تتخرب بتلك الدرجات من الحرارة.

ملاحظة : إن الزيوت والدهون التي لا تمزج بالماء لا يصلها بخار الماء وتبقى الأحياء الموجودة داخلها حية.

ب– التعقيم بالبخار المتقطع بدرجة حرارة 100°م أو التندلة Tyndallization :

سميت هذه الطريقة بالتندلة نسبة إلى الباحث تندال مكتشف هذه الطريقة في التعقيم، وتستعمل هذه الطريقة لتعقيم المواد التي تتغير خواصها الطبيعية أو الكيميائية وتتخرب بدرجات الحرارة العالية.

تتم هذه الطريقة بجهاز خاص يدعى آرنولد Arnold وهو نوع من المعقمات يحتوي على منفذ للبخار يبقى مفتوحاً على نحو لا يسمح بتجاوز درجة الحرارة 100°م، أو يمكن أن نستعمل المعقمة نفسها بعد فتح منفذ البخار، ويجري التعقيم فيه بتعريض الأوساط المراد تعقيمها للبخار ثلاث مرات مدة نصف ساعة في ثلاثة أيام متتالية متناوبة مع أوقات من الحضن، ممّا يؤدي إلى إنتاش الأبواغ الموجودة في هذه الأوساط، وثم القضاء عليها بتعريضها للبخار في اليوم التالي، إذ إنّه من المعروف أن درجة حرارة البخار 100°م تقتل الخلايا الإعاشية فقط، وتُبقي على الأبواغ.

ملاحظة : إن تسخين الأدوات بالماء بدرجة مئة مئوية لا يُعد تعقيماً ولاسيما حتى بضع دقائق، وإنما هو تطهير؛ فالتعقيم بالغليان يحتاج إلى ساعتين على الأقل ولاسيما أن بعض الفيروسات وخصوصاً الفيروس الذي يسبب داء الإنتان الكبدي لا يتلف بحرارة الغليان.

جـ- التعقيم بالتسخين المتقطع بدرجة أقل من مئة (البسترة)

Pasteurization: تستعمل هذه الطريقة في تعقيم المواد التي تفسد بالحرارة المرتفعة كالمصل الدموي الذي يتخثر بدرجة حرارة أعلى من 56°م. ويتم التعقيم بغمس السوائل المراد تعقيمها والموضوعة في زجاجات مغلقة بحمام مائي على نحو يعلو فيه مستوى الماء الساخن مستوى السائل الموجود في الزجاجة والمراد تعقيمه.

يمكن أن تُجرى عملية البسترة مرة واحدة أو مرات عديدة 3- 8 يفصل بينها 24 ساعة من الحضن؛ أي تتم العملية خلال 3 - 8 أيام متتالية، حسب المادة المراد تعقيمها.

أما المواد الغذائية (اللبن – الحليب) المراد حفظها مدة مؤقتة، فتعقم بدرجة حرارة 75°م أو 85°م مرة واحدة بإمرارها نصف دقيقة بالحرارة المطلوبة ضمن أجهزة خاصة.

ملاحظة: عند بسترة الحليب تقتل الخلايا الإعاشية، وتبقى الأبواغ حية؛ لذلك يتلف الحليب بعد مدة من الزمن.

ملاحظة: يفضل إجراء عملية تبريد مفاجئ للمواد الغذائية المعقمة بالبسترة مرة واحدة بعد التسخين مباشرة، فهذا من شأنه إحداث صدمة للأبواغ ثم يقتل منها قسم لا بأس به منها.

د- التعقيم باستعمال الحرارة الرطبة مع مادة قاتلة للجراثيم: تعتمد هذه الطريقة على التأثير الكبير للحرارة المرتفعة، بوجود مادة كيميائية قاتلة للجراثيم؛ إذ يكفي تسخين السائل حتى 100°م مدة 30 دقيقة، أما المواد الكيميائية القاتلة للجراثيم فهي عديدة، مثل: كلور الزئبق $HgCl_2$ – الفورم ألدهيد – الفينولات – أملاح الزئبق – الفينيل . بتراكيز قليلة تتراوح بين 0.002 – 0.5 % .

والمحظور الوحيد لهذه الطريقة هو وجود المادة القاتلة للجراثيم في الوسط المراد

تعقيمه؛ لذلك لا يمكننا استعمالها عند تعقيم الأوساط الغذائية المستعملة في تنمية الجراثيم، إنما يمكن استعمال الحرارة بوجود حمض أو قلوي بحيث لا يؤثر في نمو الجراثيم. وكثيراً ما تستعمل هذه الطريقة لتعقيم علب الفواكه في الصناعات الغذائية حيث تكون pH دون 4.5.

3- **التعقيم بالأشعة تحت الحمراء Infra-Red**: تستعمل الحرارة الصادرة عن الأشعة تحت الحمراء في تعقيم الأدوات الصغيرة مثل إبر التلقيح والماصات، إذ تمرر هذه الأدوات داخل أنبوبة تحتوي على سلسلة من الوحدات الحرارية، ويضبط الجهاز بحيث يتم التعقيم خلال 15 دقيقة على درجة حرارة 180°م، أما الزمن الكلي للتعقيم فهو 22 دقيقة .

4 - **التعقيم بالأمواج الدقيقة Micro Waves**: تستعمل الأمواج التي تقع بين 1000- 2500 ميغا هرتز (الميغا = مليون هرتز M.H) للتعقيم والبسترة والتجفيف. وتكمن أهمية هذه الأمواج بسرعة تسخينها للوسط، وبذلك فهي تحمل الحرارة بسرعة فائقة إلى جميع أجزاء المادة المراد تعقيمها. وخلال زمن قصير تستطيع كميات كبيرة من الطاقة أن تتحول إلى حرارة بحيث يقصر زمن التعقيم مقارنة بالزمن اللازم لوسائل التعقيم الأخرى.

ثانياً: التعقيم بالأشعة:

1- **الأشعة ذات الأمواج القصيرة (غاما X-δ)**: هي أشعة مؤينة أو مُشردة لبعض المكونات الخلوية بسبب قصر موجتها (أشعة X من 1- 100 A° ، وأشعة غاما δ من 0.01 -1 A°) واحتوائها على طاقة عالية تؤدي إلى نفوذها الشديد داخل الخلية الجرثومية، فتمنع تركيب DNA وتسبب تراكم RNA في السيتوبلاسما وتوقف الانقسام الخلوي، وتعد جراثيم *Pseudomonas* أكثر الأنواع الجرثومية تأثراً بهذه الأشعة، بينما تعد جراثيم *Clostridium* أقلها

تأثراً. أما الأبواغ Spores والفيروسات فإنها تتأثر أيضاً على أن تكون كمية الأشعة التي تتعرض لها كبيرة.

2- الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet : تستعمل الأشعة فوق البنفسجية خصوصاً لتعقيم المياه والهواء بسبب عدم قدرتها على النفوذ داخل الأجسام الصلبة. إن طول الموجة الضوئية لهذه الأشعة يتراوح بين 2500 -2800 Aº يعد كافياً لقتل الجراثيم؛ لأنه يؤثر في الحموض النووية، وإن أفضل طول موجة لقتل الجراثيم هو 253.7 نانومتراً ولكن هذه الأمواج لا تستطيع النفوذ إلا في الماء الصافي، ومن هنا يأتي عدم استعمالها الواسع في التعقيم، ويقتصر استخدامها على تعقيم السطوح فقط. للأشعة فوق البنفسجية تأثير ضار بل وخطير أحياناً بالعيون؛ لذلك يجب على العامل أن يضع نظارات خاصة أو أن يطفئ هذه الأشعة في أثناء وجوده في المختبر.

3- الأشعة الإلكترونية Electronic Radiations: تستعمل لذلك أجهزة خاصة تعتمد على إصدار الإلكترونات من منبع ما. ثم تسريع هذه الإلكترونات ضمن حقل كهربائي مفرغ من الهواء، مما يجعلها تملك القدرة على التعقيم تماماً كأشعة غاما إلا أنها أقل نفوذاً منها. لكن المحظور السيئ لهذه الطريقة أنها تحدث تغيرات كيميائية كبيرة في المواد العضوية.

4- النظائر المشعة Isotope: تستعمل هذه الطريقة لتعقيم المعدات والألبسة، حيث تملك النظائر المشعة القدرة على قتل الجراثيم والفيروسات، لكن بسبب خطورة هذه النظائر فإن التعقيم بها يتم عادة في مراكز خاصة بالدراسات النووية أو بمستشفيات كبيرة.

ثالثاً: التعقيم بالترشيح:

يستعمل الترشيح لتعقيم السوائل التي قد تتغير صفاتها عند تعقيمها بالحرارة؛

أي يستعمل لتعقيم المواد السائلة الحساسة لدرجات الحرارة العالية كالدم وبعض السكريات والفيتامينات، إذْ تقوم المرشحات بإيقاف الجراثيم والتخلص منها بطريقتين:

- الطريقة الأولى آلية (ميكانيكية): تعتمد مبدأ الغربلة، وتتوقف على قطر الثقوب الدقيقة لهذه المرشحات.

- الطريقة الثانية كهربائية: تتضمن امتزاز الجراثيم نتيجة الاختلاف في الشحنات الكهربائية لكل من المرشحة والخلايا الجرثومية. ويمكن استعمالها لعزل الجراثيم من عينة ما.

تكون المرشحات بأشكال مختلفة الشكل ١٥:

الشكل ١٥: بعض أشكال المرشحات

1- **أغشية الترشيح:** هي أغشية صناعية ذات مسام مختلفة الأقطار تتراوح بين 0.1-14 ميكروناً. تفيد لتعقيم المواد الغذائية بكفاءة عالية. كما أنها تستعمل لعزل الجراثيم من عينة سائلة يُراد اختبار وإحصاء محتواها الجرثومي (راجع فقرة تقدير عدد الخلايا الميكروبية في عينة ما) وهي تستخدم بكثرة في التحاليل الميكروبيولوجية للماء والسوائل سواء أكانت أغذية أم غير ذلك.

2- **أقراص الترشيح** : هي أقراص مصنعة من الأميانت أو الزجاج أو مواد أخرى. من أمثلتها مرشحة Seitz filter.

3 - **أسطوانات الترشيح (الشمعات)**: هي أسطوانات مصنعة من البورسلين أو من أغلفة المشطورات أو من مواد أخرى. من أمثلتها مرشحة شامبرلند Chamberland filter ومرشح بيركفلد Berkefeld filter.

وفي جميع الحالات السابقة يجب أن تكون المرشحات معقّمة ونظيفة، كما يجب تنظيفها وتعقيمها مع الجهاز المستقبل قبل الاستعمال وبعده. ويتم تنظيفها عادة بعد الاستعمال مباشرة بالماء ثم بمحلول 5% من ماءات الصوديوم إذا كانت تستعمل أكثر من مرة. أما الأغشية الدقيقة وبعض الأقراص فتستعمل عادة مرة واحدة فقط، ويُفضل ربط وعاء الاستقبال بنفير مائي أو مخلية هواء لتسريع عملية الترشيح.

رابعاً: التعقيم بالغازات وأبخرتها:

يطلق على التعقيم بالغازات التعقيم بالبرودة. وكثيراً ما يستعمل لتعقيم المواد التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية ولا تقبل الترشيح. ومن أهم الغازات السائدة:

1-**أكسيد الإتلين C_2H_4O**: أو مشتقاته كالكربوكسيد Carboxyd الذي يستعمل لتعقيم المواد البلاستيكية والمطاطية التي تتخرب بالحرارة. مثال أنابيب البولي إتلين (البلاستك) والأجهزة الإلكترونية الطبية والمحاقن وأيضاً يستعمل في تعقيم القلب والرئة الصناعية. أما تأثيره فبطيء ويحتاج لثلاث ساعات لقتل الأبواغ.

2- **أكسيد البروبلين CH_2-CH-CH_2-O** : يستعمل أحياناً عوضاً عن أوكسيد الإتلين، لتأثيره القاتل في عدد كبير من الجراثيم حتى بتركيز ١ مل/١ ل، علماً

أن قدرته على دخول الخلايا ضعيفة جداً.

3- الفورم ألدهيد HCOH: يستعمل لقتل الجراثيم وأبواغها على أن نأخذ في الحسبان مدة التعقيم وتركيز الغاز. ويُفضل أن يجري التعقيم في رطوبة نسبية تتراوح بين 80- 90% ودرجة حرارة 55-60°م إذ إن تأثيره في هذه الدرجة سيكون أسرع من تأثيره في الدرجة 37°م أما في الدرجة 18 °م فهو عديم التأثير.

4- الأوزون O_3: يتميز بلون أزرق ورائحة خاصة وتأثيره التعقيمي يكون أكبر عند توافر الرطوبة والحرارة المرتفعتين. وعندما يكون بتركيز 3 ppm (أجزاء في المليون) يقتل الفيروسات في الماء خلال 4 دقائق، أما بتركيز 1 ppm فيقتل الخلايا الجرثومية خلال ساعتين. و يستطيع القضاء على العديد من الأبواغ الجرثومية، لذلك فهو يستعمل في تعقيم مياه المجاري وتنقية مياه الشرب. الأوزون غاز سام، لذلك يجب اتخاذ الاحتياطات اللازمة عند تعقيم الأجهزة والأدوات به.

5- بيتا بروبيولاكتون β-Propiolactone : غاز عديم اللون يصبح سائلاً في درجة الحرارة العادية؛ لذلك كثيراً ما تستعمل أبخرته للتعقيم؛ إذ يقتل الجراثيم وأبواغها كما يقتل الفيروسات أيضاً. وفعاليته أكبر من الفورمول بمقدار 25 مرة ومن أكسيد الإتلين بنحو 4000 مرة. وهو غير قابل للاشتعال ولا للانفجار. يستعمل بكثرة في تعقيم الأدوات الجراحية والأوساط الغذائية وتطهير غرف العمليات.

خامساً: التعقيم الكيميائي:

تستعمل المطهرات كالكلوروفورم في تطهير الأيدي والمناضد وغيرها، ونظراً إلى كثرتها وتنوعها سنتحدث عنها بشيء من التفصيل:

المُطهّـرات
Disinfectants

تعريفها:

المطهـرات Disinfectants هـي مـواد كيميائيـة قاتلـة للجـراثيم تسـتعمل فـي التعقيم والتطهير والمداواة، ويكون استعمالها خارجياً لأن سميتها لا نوعية، فهي لا تؤثر فقط في الجراثيم، بل في خلايا العضوية، وهي تستعمل للقضاء على الأحياء الدقيقة الحيّة والحد من انتشارها ولاسيما في البيئة المحيطة بمكان العمل أو على سطح الجلد، ولا يمكن استعمالها داخلياً بسبب سميتها وعدم فعاليتها في النسج. كما تشمل المطهرات المواد الكيميائية المُعدّة لتعقيم الأدوات والأجهزة الطبية.

آلية تأثيرها:

يكون تأثيرها إما مبيداً للجراثيم أو كابحاً لها، ويمكن لهذه المواد أن تؤثر في الجراثيم بآليات مختلفة:

1- بعضـها يـؤثر بتراكيزه العاليـة فـي بروتينـات الخليـة الجرثوميـة، ويـؤدي إلـى ترسب هذه البروتينات أو مسخها وبالناتج قتل الخلية الجرثومية.

2- بعضـها يتـراكم علـى سـطح الخليـة الجرثوميـة ويبـدل الخـواص الفيزيائيـة والكيميائية للجدار الخلوي ثمّ يؤدي إلى تخريب هذا الجدار وموت الخلية.

3- يمكـن أن يـؤثر بعضـها بالأكسـدة، أو يتحـد مـع جـذر الكبريـت للإنزيمـات الجرثومية، ويؤدي إلى اضطراب استقلاب الخلية الجرثومية وموتها.

4- يؤثر بعضها في التوتر السطحي للغشاء السيتوبلاسمي للخلية الجرثومية، ويؤدي إلى اضطراب في نفوذيته.

وهناك عدة عوامل تؤثر في فعالية هذه المواد منها:

1- تركيزها في الوسط، فحسب تركيزها يمكن لفعلها أن يكون مبيداً أو كابحاً للجراثيم.

2- تماسها مع الجراثيم.

3- درجة الحرارة.

4- درجة انحلال هذه المواد.

5- نوع الجراثيم.

6- رقم pH.

7- وجود البروتينات والصوابين والشوارد في الوسط.

ونظراً إلى ذلك فإن تقدير فعالية هذه المواد يعد أمراً معقداً.

أنواع المطهرات:

بسبب اختلاف نوعية المركبات المستعملة كمطهرات، ليس هناك سوى طريقة واحدة لتصنيفها وهي طريقة التصنيف المعتمد على تركيبها الكيميائي. فحسب ذلك يمكن تصنيفها وفق الآتي:

1- الهالوجينات:

- **اليود Iode:** يعد اليود حتى يومنا هذا من أفضل المطهرات بسبب رخص ثمنه وسميته القليلة للنسج، وفعاليته على معظم الجراثيم والفيروسات والحيوانات الأوالي، ويستعمل على هيئة صبغة اليود أو محلول لوغول أو محلول اليود الغولي أو على هيئة بوفيدون إيودين وهو مركب حامل لليود يحرره عند الاستعمال باستمرار، مما يزيد من انحلاله وفعاليته.

- **الكلور Chlore:** يعد مبيداً لمعظم الجراثيم باستثناء العصيات السلّية، وهو يؤثر بالأكسدة من جهة وبالاتحاد بالبروتينات الجرثومية وتخريبها، يستعمل لتعقيم المياه ولا يستعمل طبياً، وإن مستحضره المعروف بماء جافيل (محلول

هيبو كلوريد الصوديوم) بتركيز 5% يستعمل لتعقيم الأدوات والحمامات والمراحيض، وتعد مركبات الكلور قاتلة للجراثيم بسبب تحريرها الكلور، كما أنها تؤثر في أبواغ الجراثيم.

2- الألدهيدات Aldahydes:

إن العديد من الألدهيدات لها مقدرة مبيدة للجراثيم فهي سامة بتراكيزها الخفيفة، ومرسبة للبروتينات بتراكيزها المرتفعة، وهي تؤثر ذات التأثير في خلايا العضوية والأحياء الدقيقة.

- **الفورمول Formaldahyde**: وهو فعّال في قتل الجراثيم والفطريات والفيروسات، ولكن تأثيره بطيء.

- **الغلوتار ألدهيد Glutaraldahyde**: أكثر فعالية من الفورمول وأقل تطايراً ورائحته أقل تخريشاً.

3- الغوليات (الكحولات) Alcools :

مركبات مبيدة للجراثيم بدرجات مختلفة، وتعد من المطهرات متوسطة الفعالية.

- الإتانول Ethanol: تختلف فعاليته حسب درجة تركيزه، ويعد مبيداً لمعظم الجراثيم الممرضة، بتراكيزه الملائمة، ومع ذلك تبقى بعض الأنواع الجرثومية حية في تراكيزه المثلى، وهو غير فعال في الأبواغ والفطريات والفيروسات.

ويعد الإتانول بتركيز يعادل 40-60 % الأكثر فعالية في المكورات العنقودية، وبتركيز 70 % يقتل 90 % من الجراثيم الموجودة على الجلد خلال دقيقتين شرط أن يبقى الجلد مبللاً به دون أن يجف، أما التراكيز الأكبر من 80% تعد ضعيفة الفعالية في الجراثيم.

يعد الإتانول من مرسبات البروتينات؛ لذلك فإن وضعه على الجلد لمدةٍ طويلة قد يؤدي إلى تهيجه، كما أنه لا يستعمل لتطهير الجروح العميقة؛ لأنه يزيد

الحالة سوءاً بترسيبه للبروتينات، وقد يشكل جلطة (خثرة) تحتمي بها الجراثيم وتتكاثر في طياتها.

- **الإيزوبروبانول Isopropanol** : يستعمل بتركيز 70 % مبيداً للجراثيم وهو فعال في التراكيز الأعلى من ذلك.

4- الفينول ومشتقاته Phenol :

- **الفينول (حمض الكربوليك Carbolic acid)**: تأثيره مبيد للجراثيم بمسخه للبروتينات، ولكن استعماله محدود بسبب رائحته وسميته الشديدة.

- **الكريزول Cresol** : هو من مشتقات الفينول، له تأثير مبيد لمعظم الجراثيم الممرضة بما فيها المتفطرات *Mycobacterium* بأنواعها، ولكنه سام جداً.

- **الهكزيلريزورسينول Hexylresorcenol**: تستعمل محاليله بتركيز 1/ 1000 مطهرةً للفم والبلعوم.

- **الهكزاكلوروفين Hexachlorophene** : فعّال في الجراثيم إيجابية الغرام لاسيما المكورات العنقودية، فهو يقتلها بتركيز 3 % بمدة 15 -30 ثانية، أما الجراثيم سلبية الغرام فتحتاج إلى 24 ساعة كي تموت به، ولكن بعضها يمكن أن تقاومه، وتتكاثر بداخله، فتشكل أوبئة في المستشفيات عند استعماله للتطهير.

4- الحموض Acids:

استعملت الحموض قديماً كمادةً حافظة للأغذية، ويستعمل بعضها الآن مادةً مطهرة وكأدوية، أما تأثيرها فيعود إلى زيادة تركيز شوارد الهيدروجين في الوسط، مثال: حمض الخل Acetic acid ، حمض البنزويك Benzoic acid ، حمض البوريك Boric acid، حمض اللاكتيك Lactic acid.

6- الأملاح المعدنية:

مثال أملاح الزئبق، وأملاح الفضة.

7- المؤكسدات:

إن بعض المطهرات تكون سامةً للجراثيم لأن لها المقدرة على أكسدتها، ومن أهم هذه المؤكسدات:

- **الماء الأُكسجيني (بيروكسيد الهيدروجين):** إن محلول الماء الأُكسجيني3 % في الماء يعدّ من المطهرات الخفيفة التي تستعمل لتطهير الجلد. وإن فعاليته تعود لمقدرته على تشكيل جذر الهيدروكسيل. يستعمل كمطهر للأدوات الجراحية والعدسات العينية اللاصقة.

- **بنزويل بيروكسيد:** مبيد للجراثيم بسبب تحريره البطيء للأُكسجين، يؤثر في الجراثيم اللاهوائية والأليفة لكميات قليلة من الهواء.

- **برمنغنات البوتاسيوم:** تعد تراكيزها الأكبر من 500/1 مبيدة للجراثيم ولكنها مهيجة للنسج، أما محاليلها بتركيز 1000/1 فهي الأكثر استعمالاً ولكنها تحتاج إلى أكثر من ساعة لقتل الجراثيم، ومع ذلك يمكن أن يبقى بعض من الجراثيم حياً بداخله في مثل هذا التركيز.

8- الملونات:

لا يقتصر عمل بعض الملونات على التلوين فقط؛ بل يمكن أن يكون قاتلاً للخلايا الجرثومية وخصوصاً الملونات الأساسية، فهذه الملونات لها ألفة خاصة نحو المجموعة الفُسفاتية الحمضية للبروتينات النووية أو بعض مكونات الخلية الجرثومية. ومن أهم هذه الملونات:

- **مشتقات التري فينيل ميتان Triphenylmethan:** أهمها بنفسجية الجانسيان (البلورات البنفسجية Violet crystal) التي تؤثر كمبيدة للجراثيم أو كابحة لها بتثبيطها لتصنيع الجدار الخلوي ولاسيما للجراثيم إيجابية الغرام وبعض الفطريات، أما الجراثيم سلبية الغرام والجراثيم المقاومة للحمض والغول فإنها

شديدة المقاومة لهذا الملون. ومن هنا أتت أهمية هذا الملون؛ إذ إن إضافته إلى الأوساط الزرعية للجراثيم تعطي الوسط صفة الاصطفائية لتنمية الجراثيم سلبية الغرام فقط دون السماح للجراثيم موجبة الغرام بالنمو؛ وبذلك يتم عزل الجراثيم سلبية الغرام عن باقي الجراثيم.

تستعمل محاليل البلورات البنفسجية بنسبة تتراوح بين 0.02 % حتى 0.1 % لمعالجة الأخماج القيحية، ولكن من سيئاتها أنها تصبغ الجلد بلون بنفسجي.

وأيضاً من مشتقات تري فينيل ميتان نذكر ملون الخضرة اللامعة (أخضر المالاكيت) لكن استعمالاته محدودة.

- **مشتقات الأكريدين Acridin**: هي ملونات صفراء تثبط تركيب الحموض النووية والبروتينات في الخلايا الجرثومية وخلايا الثديات، وتعدُّ مبيدة للجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام وكذلك تؤثر في الفطريات والمشعرة المهبلية.
- **ملونات أخرى**: مثل الإيوزين Eosine بمحلوله المائي 2 % الذي يُعدّ من المطهرات الجيدة، وكذلك أزرق الميتلين.

9- العوامل الفعالة في التوتر السطحي:

تستعمل هذه المركبات على نطاق واسع في المنازل أو في الصناعة كالمنظفات، وإن لبعضها المقدرة على ترسيب البروتينات أو مسخها والقضاء على الأحياء الدقيقة. ومن أهم هذه المركبات:

- **العوامل الهابطية**: وأهمها مركبات الأمونيوم الرباعية التي تؤثر في نفوذية الغشاء السيتوبلاسمي للجراثيم، وإن فعالية هذه المواد تزداد في الأوساط القلوية وتعد مبيدة للعديد من الجراثيم وخصوصاً إيجابية الغرام، ووجود الصوابين وبعض العوامل الصاعدية يقلل من فعاليتها، وهي غير فعالة في الأبواغ.

- **العوامل الصاعدية:** من أهمها الصابون والحموض الدسمة ولوريل سلفات الصوديوم Lauryl sodium sulfate التي تتفكك لتوليد الشوارد السلبية، وهذه المواد فعالة في الأوساط الحمضية وتؤثر في الجراثيم إيجابية الغرام خصوصاً. وتزداد فعاليتها بمشاركتها مع الحموض إذ تبيد معظم الجراثيم خلال 30 ثانية، تستعمل لتطهير الأدوات والأجهزة المعدة للصناعات الغذائية. وإن فعالية هذه المواد تعود إلى تأثيرها المفكك للبروتينات الشحمية الموجودة في الغشاء السيتوبلاسمي مما يحرض الإنزيمات الحالّة على تفكك الخلية الجرثومية.

إن وجود العوامل الهابطية مع العوامل الصاعدية معاً يؤدي إلى تعديل فعالية كل منهما وإبطال تأثيرهما.

10- مطهرات متفرقة:

- **الكلورهيكزيدين:** فعال في الجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام بتخريبه للغشاء السيتوبلاسمي للخلية الجرثومية.
- **الأسيتون:** يعد مبيداً للجراثيم والفيروسات ولكنه غير فعال على الأبواغ، ومزيج من الغول مع الأسيتون، من أفضل المطهرات.
- **أكسيد الإتلين:** يعد من العوامل المؤلكلة المبيدة للجراثيم والمستعملة على نطاق واسع للتعقيم الغازي.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الرابع

أوساط الاستزراع
Culture Media

تعريف أوساط الاستزراع (الاستنبات)

هي الأوساط التي تستطيع الأحياء الدقيقة أن تجد فيها جميع احتياجاتها الغذائية لتنمو وتتكاثر؛ مما يمكننا من عزلها ومعرفة نوعها. وتتألف هذه الأوساط من عناصر مغذية تلبي متطلبات النمو والتكاثر لهذه الأحياء، ونظراً إلى اختلاف هذه المتطلبات من مجموعة إلى أخرى تبعاً لخصائصها الفيزيولوجية والبيئية ومقدراتها الاستقلابية فإنه من البديهي أن نجد اختلافات مقابلة في تركيب هذه الأوساط وطبيعتها الفيزيائية والكيميائية، وهكذا يمكننا أن نميز بين مجموعتين أساسيتين من الأوساط:

- **الأوساط الحية In – Vivo**: تستعمل لتنمية الأحياء غيرية التغذية إجبارية التطفل مثل الفيروسات – الركتسيا – الكلاميديا (المتدثرات)، من هذه الأوساط بيض الدجاج – قطع الكبد – الجراثيم – خصية الأرنب.
- **الأوساط في الزجاج In – Vitro**: تعني الأوساط التي نُركّبها في المختبر من مواد طبيعية أو صنعية ونضعها في الزجاج تمهيداً لاستعماله.

لكن تباين المتطلبات الغذائية والأنماط الاستقلابية والبيئية يقود إلى تنوع حتمي أكبر في الأوساط لتلبية احتياجات المجموعات التصنيفية على مستوى الفصيلة والجنس حتى النوع والسلالات المختلفة داخل النوع الواحد؛ وهذا ما يجعل الأوساط المستعملة عملياً متعددة جداً على الرغم من أن معظمها لا يزيد على كونه وليد تعديل طفيف أو كبير لأوساط أساسية عامة بغرض جعلها أكثر

ملاءمة لتلبية حاجات الأنواع المختلفة أو أكثر كفاءة في استزراع (استنبات) أنواع محددة وعزلها للحصول على مزارع نقية. وهذا يعني أن استعمال وسط معين دون غيره يتوقف أيضاً على الغرض من الدراسة.

ويمكن أن تكون الأوساط Media المصنعة في المختبر على عدة أنماط حسب تركيبها:

- **طبيعية Natural**: تتركب من مواد طبيعية معقدة التركيب مثل مرق اللحم- الدم الآغاري – الحليب – البطاطا.
- **صنعية Synthetic** : تتركب من مواد صنعية محددة التركيب والأوزان مثل وسط شابيك – وسط سيمون.
- **نصف طبيعية Synthetic Natural**: يدخل في تركيبها مواد طبيعية ومواد صنعية مثل خلاصة الشعير المضاف إليها بعض الأملاح اللاعضوية والسكريات.

قوام الوسط: يمكن أن تكون الأوساط سائلة أو صلبة (جامدة) أو نصف صلبة (نصف جامدة) تبعاً لهدف التجربة. ويجمد الوسط عادة بمادة الأغار آغار، وهي مادة مستخرجة من بعض الطحالب البحرية مثل الجيليديوم *Gelidium* وتتكون من بروتينات سكرية، ولا تستطيع معظم الأحياء الدقيقة استقلابها والتغذي عليها (باستثناء بعض الأنواع الجرثومية). ويكون الأغار صلباً (جامداً) في درجة حرارة 42°م فما دون، ومصهوراً (مائعاً) في درجة حرارة 42°م فما فوق.

ويكفي إضافة 15غ لكل 1 ليتر من الوسط المغذي السائل لكي يصبح الوسط صلباً (جامداً) و 7 – 8 غ لكل 1 ليتر ليكون نصف صلب. ولكن الآغار عندما يتصلب يطلق كمية من بخار الماء، لذلك يجب عند زرع الأطباق

بالخلايا الجرثومية وضعها بالوضع المقلوب في الحاضنة كي لا يسيل عليها الماء ويمزج المستعمرات بعضها مع بعض.

– ويمكن أن يجمد الوسط بمادة الهلام gelatin ، وهي مادة بروتينية تستخلص من العظام وتتصلب بدرجة حرارة 25°م فما دون، وتكون مصهورة بدرجة حرارة 25°م فما فوق. ويمكن أن يستعمل وسط الهلام وسطاً تفريقياً يفرق بين نوعين أو مجموعتين من الجراثيم، المجموعة الأولى محللة للهلام والمجموعة الثانية غير محللة له حيث إنّ المجموعة الأولى تستطيع التغذي على الهلام وتحليله وتحويله من الحالة الصلبة إلى الحالة السائلة حتى في درجات الحرارة المنخفضة دون 25°م.

ملاحظة: الأطباق الحاوية على وسط الهلام لا تحضن بالوضع المقلوب في الحاضنة كي لا يسيل الهلام إذا ما تحلل أو يسيل إذا كانت درجة حرارة الحضن 37°م.

– ويمكن أن يجمد الوسط بمادة هلام السيليس.

الشروط الواجب تأمينها في الأوساط المغذية

1– **مصدر للطاقة:** إما أن يكون من الضوء مباشرة (جراثيم ذاتية التغذية) أو من بعض المركبات الكيميائية العضوية أو اللاعضوية.

2– **مصدر للكربون:** وهو إما غاز ثنائي أكسيد الكربون الجوي أو من مركبات كربونية عضوية أو لا عضوية.

3– **مصدر للآزوت:** إما من الآزوت الجوي أو من مصدر عضوي أو لا عضوي.

4– **مصدر لعنصري الكبريت والفسفور:** قد يكون الكبريت حراً أو الفسفور حراً أو أن يكون مصدرهما عضوي أو لاعضوي.

5- **عناصر نادرة :** مثل الصوديوم و الكوبالت والمغنيزيوم والمنغنيز والنحاس والتوتياء وغيرها وتستعمل بكميات زهيدة جداً، وإن زيادتها أحياناً تكون مؤذية للجراثيم.

6- **الفيتامينات وبعض الحموض الأمينية:** تساعد على نمو الجراثيم وتكون مهمة أحياناً من أجل زيادة نمو نوع معين دون الآخر.

7- **الماء:** تحتاج الجراثيم لنسبة عالية من الرطوبة، وانخفاض هذه النسبة يؤدي إلى إيقاف نموها أو موتها.

8- **الشروط البيئية والفيزيائية:** تكون هذه الشروط ضرورية لنمو الجراثيم؛ بل هي عوامل نمو محددة قد تثبط هذا النمو كلياً أو جزئياً عندما لا تكون ملائمة. ومن هذه العوامل: درجة الحرارة، الرقم الهيدروجيني pH (التي تضبط بإضافة بعض المحاليل الموقية Buffer)، الضغط الحلولي والأكسجين والإضاءة وغيرها. وأخيراً يجب أن يكون الوسط ملائماً للجرثوم نفسه.

أنماط أوساط الاستزراع (الاستنبات):

يمكن أن نُصنّف الأوساط الزرعية وفق الهدف من استعمالها إلى:

1- **الأوساط الغنية:** مثل وسط الدم الأغاري ووسط مرق اللحم. تنمو على هذه الأوساط معظم الأنواع الجرثومية وتستعمل أيضاً لتنمية الجراثيم غيرية التغذية.

2- **الأوساط المختارة:** هي أوساط مغذية أضيف إليها بعض المواد الخاصة؛ لتؤثر في نمو بعض الجراثيم مثل إضافة البلورات البنفسجية بتراكيز معينة لتزيد من نمو الجراثيم سلبية الغرام وتحدّ من نمو الجراثيم إيجابية الغرام.

3- **الأوساط التفريقية:** تساعد على التفريق بين نوعين من الجراثيم، إذ يضاف إليها بعض المواد لاختبار إمكان تحللها من قبل مجموعة من الجراثيم أو عدم

تحللها ، مثال إضافة الكازئين لمعرفة إذا ما كانت الجراثيم محللة له أو غير محللة، وكذلك إضافة الجيلاتين والدم وغيرها.

4- **أوساط التقدير الحيوي:** تكون عادة محددة التركيب، وتستعمل لقياس كمية مادة ما منتجة من قبل الجراثيم مثل قياس كمية الفيتامين أو الحمض الأميني أو الصاد الحيوي المنتج من قبل نوع معين.

5- **أوساط خاصة بتعداد الجراثيم:** تستعمل لتقدير أعداد نوع معين من الجراثيم.

6- **أوساط تحدد صفات الجراثيم:** هي أوساط نوعية تستعمل لعزل الأنواع الجرثومية التي لها مقدرة وظيفية ما، مثل الأوساط التي تحدد مجموعة جراثيم *Azotobacter* أو مجموعة جراثيم دورة الكربون.

7- **أوساط منظمة:** تستعمل للحفاظ على الجراثيم واستمرارية نموها زمناً طويلاً، حيث تضاف بعض المواد التي تحفظ المستعمرات من الفناء، وتبقيها حيّة أطول مدة ممكنة.

8- **أوساط اصطفائية تشخيصية:** تصطفي نوعاً واحداً وتميزه من باقي الأنواع الجرثومية معتمدةً على خاصة معينة يملكها دون سواه، مثال وسط E.M.B الذي يميز *E.coli* من غيرها من الجراثيم التي تنمو عليه.

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الخامس

مدخل إلى علم الجراثيم
Introduction to Bacteriology

الصفات العامة للجراثيم

تعريف الجراثيم: أحياء صغيرة الحجم جداً تنتشر انتشاراً واسعاً في الطبيعة، تعيش في المياه والتربة والهواء وفي الفجوات الطبيعية للإنسان والحيوان وعلى الجلد، تتصف بالآتي:

- مفردة الخلية.
- قد تكون متحركة أو عديمة الحركة.
- تحتوي على مادة نووية مكونة من صبغي وحيد غير محاط بغلاف (غشاء) نووي، فهي بدائية النواة procaryote .
- تتكاثر بالانقسام المباشر (الانشطار الثنائي) وبعضها يتكاثر جنسياً، يمكن لبعضها أن ينتج الأبواغ الداخلية Endospores .
- لا تحتوي الكيتين Chitin ولا السيللوز Cellulose وإنما هناك بديل عنها حمض التيكوئيك Teichoic acid .
- تعيش إما بوجود الأكسجين فتكون هوائية Aerobic أو لا تستطيع العيش بوجوده فتكون لاهوائية Anaerobic أو تستطيع العيش بوجود أكسجين الهواء أو عدم وجوده فتسمى الجراثيم اللاهوائية المخيّرة Facultatively anaerobic، وهناك بعض الجراثيم تعيش بوجود كميات قليلة من الأكسجين وتتأثر بالكميات الكبيرة منه، تسمى بالجراثيم أليفة قلة الأكسجين Microaerophilic .

تختلف أبعاد الخلايا الجرثومية حسب النوع، ومعظم الجراثيم الممرضة للإنسان بقطر 0.5 –1 ميكرون، وعندما تكون الخلايا الجرثومية عصوية لايتجاوز طولها بضعة ميكرونات، أما بعض المَلويّات فيمكن أن يصل طولها حتى 50 ميكروناً، وقد يقصر طول بعض الجراثيم إلى 0.2 ميكرون في حال بعض الركتسيات.

أشكال الجراثيم: للجراثيم أربعة أشكال رئيسة (الشكل ١٦) هي:

1- المكورات Cocci: ذات شكل كروي، تضم جراثيم غير متحركة وغير متبوغة[٥]، قطرها غالباً أقل من 1 ميكرون، تصنف تبعاً لتوضع خلاياها بعد الانقسام (حسب اصطفافها أي حسب نظام تجمعها) وفق الآتي:

- منفردة Micrococci .
- مزدوجة Diplococci ، قد تكون ذات شكل بيضوي ومثالها المكورات السحائية، والمكورات البُنّيَة التي لها شكل حبة البُن. أو تكون ذات شكل مدبب كالمكورات الرئوية.
- رباعية Tetracocci تتألف من أربع خلايا.
- رزمية Sarcinae حيث تتجمع الخلايا على هيئة كتلة مكعبية الشكل.
- عقدية وتدعى المكورَات العقدية Streptococci وقد تكون مزدوجات Streptodiplococci.
- عنقودية وتدعى المكورَات العنقودية Staphylococci.

2 – العصيات Bacilli أو Rods : ذات شكل أسطواني عصوي، وتتميز باختلاف أحجامها وتعدد أشكالها وأنماط توضعها بعد الانقسام، ويمكن تمييز الأشكال الآتية:

---

[٥] هناك جنس وحيد متبوغ يتبع إلى الجراثيم المكورة هو Sporsarcina .

- عصيات ذات نهاية محدبة مثل العصيات القولونية *E.coli*.
- عصيات ذات نهاية مبتورة مثل عصيات الجمرة *Bacillus anthracis*.
- وتدية مثال الوتديات الخناقية *Corynebacterium diphtheriae*.
- مغزلية كالعصيات المغزلية.
- عصيات منحنية كالضمة مثال ضمّات الهيضة (الكوليرا) *Viberio cholerae*.
- عصيات مكورة (عصورات) Coccobacilli وهي عصيات قصيرة.

أما تجمع العصيات فيكون كالآتي:

- منفردة Bacilli مثل العصية التيفية *Salmonella typhi* .
- مزدوجة Diplobacilli مثل الكليبسلة الرئوية *Klebsiella pneumonia*.
- سلسلية Streptobacilli مثل عصيات الجمرة *Bacillus anthracis*.
- مجتمعة كأحرف صينية مثل الوتدية الخناقية *Corynebacterium diphtheriae*.
- مجتمعة كالحزمة مثل عصيات الجذام *Mycobacterium leprae*.
- مجتمعة بشكل ريشي مثل عصيات السل *Mycobacterium tuberculosis*.

الشكل ١٦ أشكال الجراثيم.

3 – الملويّـات Spirals : تبـدو كـالخيط الملتـوي أو كالنـابض الحلزونـي، وتختلف في أطوالها وتتألف من قطعة واحدة من النابض فتأخذ شكل الضمة، أو تكون مؤلفة من 15 أو أكثر من هذه القطع. وتكون متحركة على الأغلب وفق محور رئيس. وهي على عدة أشكال:

- البورليات Borrelia مثل البورلية الراجعة.
- البريميات Leptospira مثل بريمية اليرقان النزفي.

- اللولبيات Treponema مثل اللولبيات الشاحبة.
- الملويّات Spirochaete .

4 – الشعيّات Actinobacteria: جراثيم خيطية توجد على هيئة خيوط متفرعة بأنماط عديدة حتى في الجنس الواحد، كانت تسمى الفطريات الشعاعية Actinomycetes .

ويجب التنويه إلى إن الأشكال السابقة ليست ثابتة ويمكن أن تتغير حسب وجود الجراثيم في العضوية الحية أو في المزارع وحسب تركيب هذه المزارع.

-هناك جراثيم لا تنتمي للمجموعات السابقة، مثل الركتسيات Rickettsiaceae والمتدثرات (الكلاميديا Chlamydiaceae) والمفطورات (الميكوبلاست Mycoplasma).

Damascus University

الفصل السادس

تقانة الزرع العقيم وطرائق الاستزراع
Culturing Methods

إن استزراع الأحياء الدقيقة في مزارع نقية وعزل الأنواع المختلفة يتطلب تقنية خاصة وحذراً وحرصاً شديدين، وهو يقتضي قبل كل شيء تعقيم أوساط الاستزراع وإجراء عملية الزرع في شروط صارمة تمنع حدوث أي تلوث جانبي، ثم حفظ هذه المزارع في حالة نقية وإمكان تلقيح أوساط مغذية جديدة بالمزارع النقية، على أن تجرى العمليات كافة أمام اللهب، وتعقم إبرة الزرع باللهب قبل التلقيح وبعده، بينما تمسك الأنابيب باليد اليسرى وسداداتها باليد اليمنى، ولا يجوز وضع السدادات على الطاولة، كما ينبغي إبقاء أنابيب الاختبار أفقية تقريباً وعدم تركها مفتوحة مدة طويلة من الزمن، وكذلك تمرير فوهاتها على اللهب قبل عملية النقل أو التلقيح وبعدها. وهذه العملية من شأنها قتل الجراثيم التي يمكن أن تكون على السطح الخارجي لفوهة الأنبوب، كما أنها تخلق تياراً هوائياً صاعداً يقلل من احتمالات التلوث الجانبي بجراثيم الهواء.

ونظراً إلى أن تقنية الزرع الطاهر أساسية جداً في جميع الدراسات الميكروبيولوجية يجب التدرب عليها وإتقانها قبل كل شيء. كما ينبغي دائماً في أثناء عمليات الاستزراع ترك أنبوب اختبار (أو طبق) دون تلقيح حيث يستعمل شاهداً ويدلنا في الوقت نفسه على كفاءة عملية التعقيم ودرجة إتقاننا لتقنية الزرع الطاهر.

المحاذير التي يجب ملاحظتها عند أخذ النماذج الجرثومية وزرعها:

يجب أن يتم العمل في مراحله كافة بصورة عقيمة، ويجب تجنب التلوث الجانبي. من أجل ذلك هناك عدة توصيات يجب أن نتذكرها في أثناء العمل:

1- نظافة الأيدي ولاسيما الأظفار التي يجب أن تكون قصيرة، مع ارتداء القفازات.

2- يُغطى الشعر والأنف والفم بقناع قماشي عادة.

3- يجب أن يكون مكان العمل مغلقاً تماماً، وتتم تدفئة أو تهوية المكان بأجهزة خاصة، وأحياناً نضطر إلى تنظيف مكان العمل بأكمله بالفورمول أو أية مادة معقمة أخرى، وأحياناً نعقم المكان بمصابيح للأشعة فوق البنفسجية التي نوقفها عند بدء العمل خوفاً من قتل الأحياء الدقيقة المراد دراستها من جهة، ولكي لا تؤثر تأثيراً سلبياً في العاملين من جهة أخرى.

بعد الانتهاء من عملية الزرع توضع الأحياء المزروعة في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة ولزمن مناسب مع مراعاة الآتي:

1- عدم فتح باب الحاضنة إلا للضرورة تحاشياً لانخفاض درجة الحرارة في أثناء الحضن.

2- وضع الأنابيب على حامل الأنابيب على نحو قائم.

3- وضع الأطباق مقلوبة لمنع تبخر الماء من الوسط وتكاثفه على السطح الداخلي للطبق ولتجنب التلوث.

يمكن تعرّف نوع الجراثيم بعد عمليتي العزل والزرع السابقتين بإجراء الآتي:

1- دراسة خصائص المستعمرات الظاهرية على الأوساط الزرعية المعروفة.

2- فحص الجراثيم وتلوينها لمعرفة شكل الجراثيم وتحديد نوعيّة تلوينها.

3- دراسة متطلباتها الغذائية.

4- دراسة خواصها الحيوية الكيميائية (تخمر السكريات - إماهة الهلام - إطلاق H_2S وغيرها).

5- دراسة خواصها المصلية باستعمال المصول وتفاعل التراص Agglutination .

6- استخلاص الدنا DNA وتحديد هويته.

7- دراسة خواصها الممرضة على بعض الحيوانات أو النباتات.

وتجرى دراسة الخواص المصلية والممرضة في حال الدراسات الطبية على نحو خاص.

طرائق تحضير المزارع الجرثومية

يطلق اسم المزرعة الجرثومية على النمو الحاصل عند استزراع الجراثيم على الأوساط الغذائية المختلفة، وهي ناتج لـ ٢٠-٣٠ عملية انقسام خلوي متتابعة لجرثوم واحد على وسط صلب. ويجب التمييز بين المزرعة الجرثومية النقية Pure التي تحتوي على نوع واحد فقط من الجراثيم، والمزرعة الجرثومية المختلطة Mixed التي تحتوي على عدة أنواع جرثومية، وهو ما يميز البيئات الطبيعية التي تختلط فيها الأنواع مما يحتم علينا عزلها اعتماداً على بعض الصفات الشكلية لمستعمرات هذه الأنواع، تختلف طرائق تحضير المزارع الجرثومية باختلاف الأنواع الجرثومية واختلاف هدف الدراسة، فإذا كانت كمية الجراثيم كبيرة فإننا نزرعها في أوساط صلبة، بينما نزرع الكميات القليلة من الجراثيم على أوساط سائلة بغية زيادة عددها. وبهذا يمكن التمييز بين نوعين من المزارع (الشكل ١٧).

آ - المزارع السائلة التي تجرى عادة في أنابيب اختبار.

ب - المزارع الصلبة ويوجد منها ثلاثة أنواع تختلف باختلاف هدف الدراسة وهي: 1- مزارع الأطباق. 2- مزارع الآغار المائل. 3- مزارع الآغار العميق.

طرائق الاستزراع

أولاً : الاستزراع في الأنابيب

١- **الاستزراع في وسط سائل Liquid culture:** تُعَدُّ هذه الطريقة من أسهل الطرائق وتتضمن استزراع الجراثيم في أنابيب اختبار تحتوي على وسط مغذ

الشكل ١٧ أنماط المزارع الجرثومية.

مناسب (ماء + مواد مغذية) ويبدو نمو الجراثيم في مثل هذه الأوساط بأحد الأشكال الآتية:

١-عكر ٢- تشكل غشاء رقيق على السطح ٣- ظهور ترسبات في قعر الأنبوب ٤-حدوث لزوجة للوسط نتيجة إفراز مواد مخاطية ٥- تكوّن غاز ذائب في الوسط.

ويتم نقل الجراثيم إلى الوسط الغذائي السائل بإبرة التلقيح ذات العقدة حيث تكفي قطرة من السائل لنقل ملايين الجراثيم من وسط إلى آخر.

نستعمل الوسط السائل لعدة أهداف مثل إكثار الجراثيم – دراسة إطلاق غاز – دراسة بعض الخصائص الحيوية الكيميائية وغير ذلك.

2 – **الاستزراع فوق سطح مائل من الوسط الصلب:** تدعى هذه الطريقة من الاستزراع الآغار المائل Agar slope أو Slant وتتضمن الاستزراع في أنابيب اختبار حاوية على وسط مغذ مضافاً إليه الآغار ومبرداً في وضعية

مائلة. وتعد هذه الطريقة مجدية نظراً إلى أن من شأنها زيادة السطح القابل للزرع وسهولة تلقيح الأنابيب وملاءمتها لاستزراع الجراثيم الهوائية أو اللاهوائية المخيّرة، بالإضافة إلى ذلك فهي تمكننا من ملاحظة بعض خصائص المستعمرات الجرثومية كإنتاج الأصبغة. ويتم النقل بوضع إبرة التلقيح الحاملة للجراثيم في الجزء السفلي من الأنبوب ثم فرشها على سطح الآغار من الأسفل إلى الأعلى بطريقة التخطيط (الشكل ١٨).

3- **الاستزراع في الآغار العميق:** تنمو الجراثيم داخل أنابيب اختبار حاوية على وسط مُغذٍّ صلب، ويتم ذلك بطريقتين:

- **طريقة الوخز Stab:** (طريقة الآغار المطعون) ويتم تحضير الآغار العميق بصب الآغار المغذي داخل الأنابيب وبعد التعقيم يترك ليبرد ويتجمد في وضعية قائمة، ثم تغرس إبرة التلقيح الحاملة للجراثيم مرة واحدة وعلى نحو مستقيم داخل الوسط المغذي وتسحب أيضاً على نحو مستقيم بحيث لا تؤثر في تماسك الوسط المغذي (الشكل ١٨).

- **طريقة الرّج Shake:** يتم تحضير المزرعة بتلقيح الوسط الصلب داخل الأنبوب بعد تمييعه، ثم رج الأنبوبة بهدف الحصول على توزيع منتظم للجراثيم قبل تصلب الوسط. وتسمى المزرعة في هذه الحالة، مزرعة متساوية التوزيع، وكثيراً ما تستعمل لعزل الجراثيم اللاهوائية.

وتستعمل هاتان الطريقتان خصوصاً لمعرفة الاحتياجات الهوائية للجراثيم (الشكل١٩).

ثانياً – الاستزراع في أطباق plates:

يجري الاستزراع في أطباق حاوية على وسط مغذ بثلاث طرائق رئيسة. وهي طرائق جيدة للحصول على مستعمرات جرثومية معزولة بعضها عن بعضٍ.

الشكل ١٨ رسم يوضح طريقة الوخز وطريقة التخطيط في الأنبوب.

الشكل ١٩ مناطق نمو الجراثيم في الأغار العميق حسب الاحتياجات الهوائية.

إن إضافة مادة مجمدة كالأغار إلى الوسط السائل broth تؤدي إلى تكوين وسط صلب، والخلايا الجرثومية التي تزرع في مثل هذا الوسط تتكاثر في مكانها لتكوين كتلة مرئية بالعين المجردة ندعوها المستعمرة Colony فكل خلية حية

(أو مجموعة خلايا) تعطي عند زرعها مستعمرة منفصلة مستقلة يمكن تمييزها من بقية المستعمرات وعزلها، ونعتمد في ذلك على بعض الخصائص الشكلية لمستعمرات الأنواع المختلفة في وسط معين.

هذه الطرائق هي:

1- طريقة التخطيط Streak plates فوق سطح الوسط المجمد: تتضمن هذه الطريقة ثلاث خطوات متتالية هي:

الخطوة الأولى: صب الوسط المغذي المعقم في طبق بتري معقم مع أخذ الاحتياطات اللازمة لمنع حدوث أي تلوث جانبي.

الخطوة الثانية: تعقيم إبرة التلقيح على اللهب بطريقة الإحماء.

الخطوة الثالثة: بعد تجمد الوسط المغذي نلقحه على السطح بطريقة الخطوط التي يمكن تنفيذها بأنماط عديدة.

ويهدف التخطيط إلى تخفيف اللقاح إلى أقصى درجة ممكنة، وبهذا يظهر النمو الجرثومي في نهاية الخطوط على هيئة مستعمرات نقية مفردة Single colonies مناسبة للعزل والدراسة. ويمكن تخطيط **الأطباق الحاوية على وسط عزل مناسبة للحصول على مستعمرات منعزلة (الشكل ٢٠) وفق مراحل العمل الآتية:**

1 – اقسم الطبق بخطوط وهمية إلى أربعة أقسام.

2- ضع قليلاً من المزرعة المراد تخطيطها على طرف طبق بتري بإبرة التلقيح المعقمة والمبردة ثم خطط في الاتجاه الأول.

3- عقّمْ الإبرة وبَرِّدْها ثم أدِرْ الطبق وخطِّطْ في الاتجاه الثاني ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الأول.

4- عَقّمْ الإبرة مرة أخرى وبرّدها ثم أدر الطبق وخطط في الاتجاه الثالث ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثاني.

5- عَقّمْ الإبرة مرة أخرى وبرّدها ثم أدر الطبق وخطط في الاتجاه الرابع ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثالث.

6 – احضن الطبق، فتنمو عليه مستعمرات نموذجية.

الشكل ٢٠: يوضح تخفيف اللقاح بطريقة التخطيط.

2- طريقة النشر على سطح طبق بتري: تستعمل للتحري عن محتوى عينة سائلة من الجراثيم وإحصاء الجراثيم الموجودة داخل هذه العينة. وتتم بأخذ كمية معينة من العينة السائلة وفرشها على سطح طبق الآغار بالمِلْوَقة (السباتيول)،

المعقم إما بالحرارة الجافة بعد لفه (قبل إجراء التجربة)، أو بغمسه بالكحول (في أثناء العمل) ثم تمريره على اللهب (الشكل ٢١)، وبعد عملية الفرش يُترك الطبق كي يجف ويمتص السائل الموجود على سطحه، ثم يحضن بالوضع المقلوب.

الشكل ٢١ طريقة النشر على سطح طبق بتري

(a) مراحل إجراء طريقة النشر :

1 – انقل كمية معينة من العينة المدروسة باستعمال الماصة المعقمة ، إلى مركز سطح الآغار المغذي في الطبق

2 – ضع الملوقة(الناشر) في الكحول

3 – عقم الملوقة باستعمال اللهب ، ثم برده.

4 – انشر العينة على كامل مساحة الطبق الحاوي على الوسط المغذي باستعمال الناشر، ثم احضن الطبق.

(b) مستعمرات جرثومية نموذجية نمت على الطبق المزروع بطريقة النشر .

3- **طريقة الآغار المصبوب:** تتضمن توزيع الجراثيم أو الفطريات المراد استزراعها في جميع أرجاء الوسط، وهذه الطريقة مفيدة للحصول على مستعمرات مستقلة ثَمَّ عزل الأنواع الميكروبية المختلفة الموجودة في خليط من الوسط الطبيعي أو المرق المغذي، كما أنها الطريقة الدستورية لتقدير عدد الخلايا الجرثومية في عينة ما(راجع فقرة تقدير العدد الجرثومي في عينة ما).

وتختلف عن الطريقة السابقة في أن عملية الاستزراع تتم قبل تجمد الوسط الآغاري بدرجة 45°م- 50°م، كما تسمح بإجراء تخفيف للأحياء الموجودة بكثافة في الوسط، وهذا التخفيف يتضمن استعمال تراكيز متدرجة من معلق العينة. ويفضل استعمال التخفيف المناسب الذي يسمح بالحصول على مستعمرات منفصلة من جهة، وتظهر فيه جميع الأشكال النامية في الوسط من جهة أخرى. وهذا يعني أن التخفيف البسيط المحدود والتخفيف الشديد غير مناسبين، والتجربة تدلنا على التخفيف الأفضل الواجب تطبيقه (الشكل ٢٢).

ونذكر أن عملية التجانس (التوزيع المنتظم للجراثيم) مهمة جداً في هذه الطريقة، فيجب علينا أن ندوّر الأنابيب بين راحتي اليدين عدة مرات أولاً قبل أخذ العينة إلى الأطباق، ثم إدارة الطبق، بعد صب الآغار على العينة، بحركة دائرية وهو على سطح المنضدة.

وهذه الطريقة تسمح عند استعمال التخفيف المناسب بالحصول على مستعمرات سطحية منفصلة من جهة ومستعمرات مغموسة في الوسط المغذي من جهة أخرى، مما يمكّن من عزلها وإتمام دراستها.

الشكل ٢٢ رسم يوضح مراحل طريقة الآغار المصبوب مع التخفيف.

صفات المزارع ونمط النمو

تتم هذه الدراسة لتوصيف أشكال ومظاهر النمو المختلفة للجراثيم على مختلف الأوساط الغذائية:

أولاً: مظاهر النمو على أنبوبة الآغار المغذي المائلة (الشكل ٢٣):

1- نمو خيطي منتظم على طول خط التلقيح.

2- نمو مسنن (قوقعي) تكون فيه أطراف خط النمو مسننة.

3- نمو حبيبي تكون المستعمرات النامية منفصلة أو شبه مندمجة على طول خط التلقيح.

4- نمو متناثر حيث يكون النمو رقيقاً على هيئة ستار ويكون منتشراً عادة.

5- نمو شجري (متفرع) يكون النمو على هيئة شجرة.

6- نمو جذري يكون على هيئة الجذر.

الشكل ٢٣ مظاهر النمو على سطح أنبوبة آغار مائلة.

ثانياً: مظاهر النمو الجرثومي في وسط المرق المغذي: يصنف النمو في المرق كالآتي:

أ- **السطح:** أشكال النمو السطحي أربعة (الشكل ٢٤) وهي:

1- حلقي: يكون النمو على هيئة حلقة حول حواف الأنبوبة.

2 - أملس رقيق: يكون النمو على هيئة طبقة رقيقة ملساء تغطي سطح الوسط.

3- غشائي: النمو يشبه الغشاء الرقيق، لكنه أرق من سابقه.

4 - مجعد: يكون النمو على هيئة كتل طافية متماسكة.

الشكل ٢٤ أشكال النمو السطحي في بيئة المرق المغذي

ب – تحت السطح: يكون النمو كالآتي:

1– عكر: يظهر النمو على نحو سحابي.

2– حُبيبي: يظهر النمو على هيئة حبيبات صغيرة.

3– صوفاني: يظهر النمو على هيئة كتل صغيرة طافية ومنتشرة.

4– قشري (رقائق): يظهر النمو على هيئة كتل كبيرة في المعلق.

جـ – الراسب: تتفاوت كمية الراسب في الأنبوبة من لا شيء إلى كمية كبيرة. لتوصيف نوعية الراسب نهز الأنبوبة بحيث يصبح الراسب على هيئة معلق، ويمكن أن يكون عندها الراسب إما حُبيبياً أو رقيقاً (قشرياً) أو خيطياً حريرياً أو لزجاً (لاختبار اللزوجة يمكن أن نلمس قاع الأنبوب بإبرة التلقيح).

د – كمية النمو: لتقدير كمية النمو يجب هزّ الأنبوبة ثم نقدّر النمو بالنظر على أنه ضئيل أو متوسط أو غزير.

ثالثاً : مزرعة الوخز في الهلام: بعد تلقيح أنابيب الهلام المغذي العميق بطريقة الوخز والحضن بالحرارة المناسبة، تُفحص الأنابيب من النواحي الآتية:

1– **النمو:** وجوده من عدم وجوده. أغلب الجراثيم لا تنمو على الهلام المغذي.

2- **إسالة الجيلاتين:** بعض الجراثيم تنتج إنزيمة الجيلاتيناز Gelatinase التي تعمل على حلمهة الهلام وتؤدي إلى سيولته أو ميوعته، وتكون الإسالة حسب النماذج الموضحة (الشكل ٢٥) وهي:

أ- إسالة على هيئة طبق صغير (إبريق).

ب- إسالة على هيئة كأس.

جـ - إسالة على هيئة قمع أو مخروط مقلوب.

د- إسالة على هيئة أنبوب.

هـ - إسالة على هيئة أسطوانة، يكون التحلل في الجزء العلوي من الأنبوبة فقط.

الشكل ٢٥ أنواع إسالة الجيلاتين.

رابعاً: طبق الآغار المغذي: تدرس المستعمرات النامية على سطح الآغار المغذي باستخدام عدسة يدوية أو بمساعدة مكبرة، حيث يتم تسجيل الآتي: لون المستعمرة، وعتامة المستعمرة ، وشكل المستعمرة، وارتفاع المستعمرة عن سطح

الوسط، وحافة المستعمرة، لزوجة المستعمرة، وحسب ما هو موضح (الشكل ٢٦).

أ – مظهر المستعمرة على سطح طبق الآغار

ب – ارتفاع المستعمرة عن سطح طبق الآغار

ج – حواف المستعمرة النامية على سطح طبق الآغار

الشكل ٢٦ أوصاف المستعمرات النامية على سطح الآغار.

عزل المزارع الجرثومية

يمكن عزل الجراثيم من بيئتها الطبيعية (الماء– الهواء– التربة– الأغذية– عينات مرضية). وتختلف طرائق العزل هذه حسب البيئة؛ فلكل بيئة خاصية

معينة وتُعزل الأنواع الجرثومية عموماً بدءاً من المستعمرات المنفصلة النامية فوق وسط من الآغار المغذي والمستنبتة بطريقة الخطوط أو بطريقة النشر على سطح طبق بتري أو بطريقة الآغار المصبوب، ويكون ذلك بنقل جزء من هذه المزارع بإبرة الزرع على وسط مغذ مناسب ثم حضنه بدرجة حرارة مناسبة ولزمن مناسب كي نحصل على نمو جيد.

ويمكن اختبار عملية العزل هذه بإعادة الزرع على وسط مغذ مناسب في أطباق بتري بطريقة الخطوط أكثر من مرة حتى نحصل على نمط واحد من المستعمرات الجرثومية.

وينبغي تجديد الجراثيم المعزولة والمحفوظة بين مدة وأخرى، لأن بقاءها مدة طويلة جداً في الثلاجة يمكن أن يؤدي إلى حدوث الطفرات، ولكي نتجنب ضرورة تجديد الوسط والنقل المتكرر للمزارع النقية نعمد إلى حفظها في شروط تسمح ببقائها حية دون نمو ودون أن تعاني من تغيرات وراثية أو فيزيولوجية. وتعدُّ طرائق التبريد والتجفيف أفضل الطرائق لحفظ المزارع الجرثومية في حالة سبات.

طرائق حفظ المزارع الجرثومية

أولاً : الحفظ لمدة قصيرة الأجل

1- الزراعة المتكررة: وهي طريقة تقليدية لحفظ المزارع الجرثومية حيث تتم عملية الزراع المتكرر في أوساط حديثة التحضير ضمن أنابيب من الآغار المغذي المائل. وتختلف المدة الزمنية للحفظ حسب النوع الجرثومي ونوع الوسط والظروف الخارجية، تصلح هذه الطريقة لحفظ الجراثيم عدة أسابيع عادة (نحو شهرين).

2- **الحفظ تحت طبقة من الزيت المعدني:** يستطيع العديد من الأنواع الجرثومية أن يظل حياً أشهراً وسنيناً تحت طبقة من الزيت المعدني المعقم. حيث تتم تنميتها في الوسط المناسب في صورة سائلة، وعند درجة حرارة مناسبة حتى نحصل على نمو جيد، ثم يضاف الزيت المعدني المعقم، وتحت ظروف التعقيم بحيث يغطي النمو (يضاف بنسبة 15-20 % من حجم الوسط) وتحفظ المزارع في الثلاجة عند الدرجة صفر إلى 20°م، وتتم مراقبة حيوية هذه الجراثيم على أوقات زمنية متتالية، ويمكن نقل المزرعة الجرثومية من تحت الزيت المعدني إلى وسط حديث التحضير مع أخذ الحذر إذ إن الزيت المعدني قابل للاشتعال.

3- **الحفظ بالغليسيرول المعقم:** تجري تنمية الجراثيم بأنبوب حاوٍ على وسط سائل مناسب، حتى يبلغ بداية العكارة (ما يعادل Mc. Farland 0.3)[*]، ثم نضيف إليه مقداراً من الغليسرول المعقّم يساوي ثلث كمية الوسط السائل، ونمزجها جيداً، ثم نحضن لمدة ساعة كاملة في درجة حرارة مناسبة.

نوزع ما بداخل الأنبوب على أنابيب صغيرة معقمة (مثل أنابيب التثقيل سعة 1.5 مل ذات الغطاء، Ependrove) بمقدار 1 مل لكل أنبوب ونحفظها بالمجمدة عند درجة حرارة - 20 مْ - 80 مْ، وعند الاستعمال نقوم بتنشيط الخلايا الجرثومية بزرعها على أوساط استزراع سائلة مناسبة.

4- **التجميد المباشر:** يجري ذلك بتجميد الخلايا الجرثومية مباشرة عند الدرجة صفر إلى -20°م ، وربما تنجح هذه الطريقة ولكن لا يوصى باتباعها حيث

---

[*] Mc. Farland وحدة قياس تستعمل لتقدير عدد الخلايا الجرثومية في الأوساط السائلة. وكل (1) .MC.F يساوي 3×10^{8} خلية جرثومية /مل.

تتعرض الخلية الجرثومية للتخريب، ومع ذلك فهناك بعض الأنواع الجرثومية يمكن أن تحفظ بهذه الطريقة مدة تتراوح بين ستة أشهر إلى سنتين.

5- **التجفيف:** يموت معظم الأنواع الجرثومية إذا ترك يجف في المختبر إلا أن الأنواع التي تستطيع إنتاج الأبواغ Spores يمكن أن تحفظ بالتجفيف في الوسط المناسب سواءً في التربة أم في شرائط أم أقراص الترشيح أم في الهلام.

ثانياً: الحفظ لمدة طويلة الأجل:

1-التجفيف مع التجميد (التجفيد) Freeze-drying (Lyophillzation):

هذه واحدة من أفضل الطرائق لحفظ الجراثيم والأحياء الدقيقة الأخرى، حيث تظل هذه الكائنات في صورة حية مدة تصل إلى ثلاثين عاماً. تعتمد فكرة هذه الطريقة على إزالة الماء من داخل المعلق الجرثومي، وعند الحاجة إليها يمكن إعادة تعليقها في الماء بسهولة مرة أخرى.

2- التجميد العالي والحفظ تحت النتروجين السائل:

يتم التجميد السريع والحفظ في حالة مجمدة عند درجة حرارة النتروجين السائل (- 196°م) وتصلح هذه الطريقة لحفظ المزارع الجرثومية لمدة عشرين عاماً.

الفصل السابع

تقدير عدد الخلايا الجرثومية في عينة ما
Estimating Microbial Cell Count in a Sample

بما أن الاختبارات الميكروبيولوجية تعتمد على إجراء اختبارين أساسيين هما:

- اختبار كمي للأحياء الدقيقة: أي تقدير عدد الجراثيم والخمائر والفطريات الموجودة في العينة عموماً.
- اختبار نوعي للأحياء الدقيقة: ويتعلق هذا الاختبار بتحديد الزمرة الجرثومية؛ أو النوع الجرثومي المراد التحري عنه.

لذلك يتحتم علينا معرفة الطرائق التي تمكننا من تقدير العدد الكلي للخلايا الجرثومية في عينة ما، والتي تقسم إلى:

١- تقدير العدد الكلي للخلايا الميكروبية باستعمال المجهر.

٢- تقدير العدد الكلي للخلايا الميكروبية بإجراء إحصاء للمستعمرات على أوساط خاصة بالعد.

١- الطرائق المجهرية

يتم التعداد مباشرة بالمجهر في محضرات ملونة، حيث ينشر حجم معلوم من المزرعة أو المعلق الجرثومي (٠.٠١ مل) بانتظام على مساحة معلومة من صفيحة زجاجية حيث يثبت الغشاء الناتج ويلون، ثم تحصى الجراثيم الفردية في الساحة المجهرية؛ ويحسب عدد الخلايا في ١ مل من المعلق (هذه طريقة قديمة)، تستعمل حالياً صفائح خاصة مثل صفيحة بتروف هوسر Petroff-Hausser وهي صفيحة فيها حجرة للعد تساعد على إجراء الإحصاء بدقة وسرعة دون تلوين (الشكل٢٧) تستعمل غالباً على التكبير 400x أو 500 x.

ولحساب وسطي عدد الجراثيم نحسب عدد الجراثيم بأفضل تركيز للخلايا في المربع (الموضح بالشكل٢٧) وفق الآتي:

- كل ٢٥ مربعاً تغطي مساحة ١مم٢، وعليه يكون العدد الكلي للجراثيم في ١مم٢ في الحجرة يساوي عدد الجراثيم في المربع × ٢٥. وبما أن عمق الحجرة ٠.٠٢مم فعليه يكون حجم السائل المحجوز في شبكة المربعات (حجم العينة) يساوي:

١×١×٠.٠٢ مم٣ = ٠.٠٢ مم٣ = ٠.٠٢×١٠$^{-٣}$ سم٣ (مل)

وحسب القانون:

$$\text{عدد الجراثيم في ١ مل} = \frac{\text{عدد الجراثيم في العينة}}{\text{حجم العينة}}$$

$$\text{إذاً: عدد الجراثيم في ١ مل} = \frac{\text{عدد الجراثيم في المربع} \times ٢٥}{٠.٠٢ \times ١٠^{-٣}}$$

وبالتالي: عدد الجراثيم في مل = عدد الجراثيم في المربع × ٢٥ ×٥٠×١٠^{٣}

مثال: إذا أمكن عد ٢٨ خلية جرثومية في المربع يكون عدد الجراثيم في ١ سم^{٣} يساوي

عدد الجراثيم في ١ سم^{٣} = ٢٨×٢٥×٥٠×١٠^{٣} = ٣.٥ × ١٠^{٧} خلية / سم^{٣}.

وإذا كانت العينة المدروسة ممددة، فعلينا أن نضرب بمقلوب التخفيف.

الشكل ٢٧ حجرة بيتروف هوسر للعد.

a-منظر جانبي لحجرة العد يظهر الساترة الزجاجية التي تحتجز تحتها عينة البكتريا المراد عدها.

b- منظر علوي لحجرة العد يظهر شبكة العد في وسط الصفيحة.

c- تكبير لشبكة عد الجراثيم في مركز المربعات المعدودة، وعدد المربعات ٢٥ مربعا.

من عيوب هذه الطريقة :

أ- أنها تعطي العدد الكلي للخلايا الحية والميتة.

ب- ليست كافية في حالة المعلقات المخففة جداً.

جـ- طريقة مجهدة للنظر .

٢- طريقة الأطباق

تعتمد هذه الطريقة على استزراع الجراثيم (١ مل أو ١ غ من العينة المراد فحصها) في أوساط غذائية صلبة ملائمة داخل أطباق بتري معقمة، وتحضين هذه الأطباق بدرجة حرارة مناسبة ثم إحصاء عدد المستعمرات النامية فيها (أو ما يسمى cfu=colony forming unit) بعد مدة زمنية معينة تختلف باختلاف النوع الجرثومي المدروس، يمكن أن نحصل بهذه الطريقة على عدد كبير من المستعمرات التي تتداخل في حدودها فيكون احتمال الخطأ كبيراً، لذلك يجرى تخفيف متدرج للعينة المدروسة (انظر الشكل ٢٢) لدرجة تسمح بظهور عدد من المستعمرات في الأطباق يتراوح بين ٣٠ و ٣٠٠ مستعمرة.

وبمعرفة التخفيف نستطيع معرفة عدد الجراثيم الموجودة في ١ مل؛ عن طريق إجراء عملية ضرب لمعدل وسطي عدد الجراثيم في المكررات للتخفيف الواحد بمقلوب التخفيف نفسه.

يمكن إجراء العدّ بالعين المجردة، أو يمكن استعمال المكبرة، أو استعمال عدّادة الجراثيم لتسهيل عملية العد.

ولكنّ لهذه الطريقة عيوب أيضاً من أهمها:

أ- تحتاج إلى وقت طويل نسبياً.

ب- قد تشترك أكثر من خلية جرثومية لإعطاء مستعمرة واحدة.

جـ- قد تكون شروط ووسط الاستزراع غير ملائمة لنمو جميع الخلايا الجرثومية، فقد يكون هناك جراثيم لم تستطع التعبير عن نفسها وإظهار المستعمرات. وبذلك يكون العدد الكلي المقدر أقل من العدد الحقيقي الموجود في ١ مل من العينة.

نظراً إلى أهمية هذه الطريقة وكثرة استعمالها، سنشرح مثالاً مفصلاً في نهاية الفصل من خلال تطبيقها على دراسة جراثيم الحليب.

٣- طريقة الوسط السائل

تستعمل هذه الطريقة لتقدير العدد التقريبي للجراثيم أو المجموعات الجرثومية الحية والنشيطة الموجودة في عينة ما مثل الأغذية أو الماء، وتجرى خصوصاً لإحصاء الجراثيم القولونية Coliforms؛ حيث تلقح أوساط غذائية سائلة ملائمة (مثل وسط ماكونكي السائل) وموزعة في أنابيب اختبار بمعلق العينة المتدرج في التخفيف؛ وتحضن في شروط مناسبة مدة زمنية مناسبة.

تنمو الجراثيم القولونية في هذه الأوساط على هيئة عكر أو غشاء أو راسب مع إطلاق غاز أو تغيير لون المشعر... حسب النوع الجرثومي.

وتعد هذه الأنابيب موجبة مقارنة بالأنابيب السلبية التي لا تبدي مثل هذه الصفات، ثم نحسب العدد الأكثر احتمالاً أو العدد الأرجح (MPN). Most probable number والذي يسمى بالعدد الاحتمالي أو التقريبي؛ ويمثل تقدير كثافة الأحياء الحية Viable organisms في الوسط الغذائي أو العينة؛ وهو مشتق من تطبيق نظرية الاحتمالات عند حساب كثافة الأحياء الدقيقة في الوسط الغذائي. ويقدر العدد الأرجح الأعداد الحية لجراثيم القولون فقط (مجموعة الكوليفورم Coliform bacteria).

نقدر العدد الأرجح بالرجوع إلى جداول العد التقريبي (الجدول ٤).

يمكن حساب عدد الجراثيم الأكثر احتمالاً في ١ غ أو ١ مل من العينة بعد تلقيح أوساط الزرع السائلة بكمية معلومة من معلق متدرج بالتخفيف من العينة، حيث يعمل ٣ أو ٥ مكررات من التخفيف الواحد؛ وتستعمل لذلك ٣ تخفيفات. ويحدد عدد الأنابيب الموجبة في كل تخفيف. وبالرجوع إلى الجداول نحصل على العدد الأكثر احتمالاً MPN/g.

الجدول ٤ العدد الأكثر احتمالا MPN لجراثيم الكوليفورم في عينات الأغذية.

Pos. tubes			Conf. Lim.			Pos. tubes			Conf. lim		
1	.1	.01	MPN/g	Low	High	1	01	.01	MPN/g	Low	High
0	0	0	.000	.000	.950	2	2	0	2.11	.452	4.25
0	0	1	.301	.015	.960	2	2	1	2.76	.870	9.45
0	1	0	.305	.015	1.07	2	2	2	3.48	.870	9.45
0	1	1	.611	.124	1.81	2	3	0	2.86	.870	9.45
0	2	0	.619	.124	1.81	2	3	1	3.60	.870	9.45
0	3	0	.944	.356	3.75	3	0	0	2.31	.458	9.45
1	0	0	.357	.017	1.81	3	0	1	3.85	.870	10.5
1	0	1	.723	.126	1.82	3	0	2	6.36	1.68	18.3
1	0	2	1.10	.356	3.75	3	1	0	4.27	.900	18.3
1	1	0	.736	.126	2.03	3	1	1	7.49	1.69	20.0
1	1	1	1.12	.356	3.80	3	1	2	11.5	3.70	42.5
1	2	0	1.14	.356	4.20	3	1	3	15.9	4.00	42.5
1	2	1	1.54	.450	4.20	3	2	0	9.33	1.81	42.5
1	3	0	1.57	.452	4.20	3	2	1	14.9	3.70	42.5
2	0	0	.918	.144	3.75	3	2	2	21.5	4.00	42.7
2	0	1	1.43	.362	4.20	3	2	3	29.2	9.00	100.
2	0	2	1.99	.452	4.20	3	3	0	24.0	4.20	100.
2	1	0	1.47	.368	4.20	3	3	1	46.2	9.00	200.
2	1	1	2.05	.452	4.20	3	3	2	110.	18.0	410.
2	1	2	2.68	.870	9.45	3	3	3	-	42.5	-

٤- طريقة الترشيح الغشائي

طريقة مهمة وضرورية في حال دراسة العينات التي تحتوي على أعداد قليلة جداً من الجراثيم مثل اختبار تلوث عينات الماء بالسلمونيلة، واختبار تلوث

الهواء، كما يمكن استعمالها لاختبارات تلوث الأغذية، حيث يجري ترشيح جراثيم العينة وحجزها بأوراق ترشيح خاصة مختلفة في أقطار مسامها، ثم توضع ورقة الترشيح هذه داخل أطباق إحصاء خاصة؛ وتحصى إما مباشرة أو بعد تلوينها أو يمكن أن تحضن أوراق الترشيح في شروط مناسبة؛ ثم تحصى المستعمرات النامية بعد مدةٍ معينة (الشكلين ٢٨، ٢٩).

الشكل ٢٨ رسم تخطيطي يوضح طريقة الإحصاء باستعمال أغشية الترشيح.

الشكل ٢٩ مستعمرات نامية على أغشية الترشيح، عينات من أغشية الترشيح على أوساط مختلفة: (a) وسط الآغار المغذي لعد الجراثيم. (b) وسط الجراثيم المعوية البرازية حيث تبدو المستعمرات زرقاء .(c) وسط ورث آغار لتنمية الخمائر والفطور.

الفحص الميكروبيولوجي للحليب
Microbiological Testing of Milk

يعد الحليب وسطاً جيداً لنمو كثير من أنواع الأحياء الدقيقة كالجراثيم وبعض الخمائر والأعفان. وما أن تصل هذه الأحياء إلى الحليب حتى تنشط وتتكاثر بسرعة في درجة الحرارة الملائمة لها، نظراً إلى أنه يحتوي على جميع المواد الغذائية الضرورية لنموها.

تتلخص أهمية دراسة الأحياء الدقيقة في الحليب ومنتجاته بالآتي:

- الأضرار التي تسببها للحليب ومشتقاته، سواء أكانت في مراحل التحضير أم بعدها؛ وتقع المسؤولية على المنتج.
- الاستفادة من بعض أنواع الأحياء الدقيقة في صناعة بعض المشتقات مثل اللبن والجبنة والزبدة وغيرها.
- الأمراض التي تسببها بعض الأحياء الدقيقة للإنسان بوساطة الحليب ومشتقاته، مثل السل، الحمى التيفية ونظيرة التيفية، الهيضة (الكوليرا) وغيرها.

مصادر تلوث الحليب

هي مصادر عديدة جداً منها:

١- **الحيوانات الحلوبة:** أهم مصادر التلوث من الحيوانات الحلوبة هي الأحياء الدقيقة الموجودة طبيعيا داخل الضرع وخارجه، وعندما يكون الحيوان مصاباً بمرض.

يكون الحليب معقماً عادة عندما يُفرز من الحيوانات السليمة، إلا أنّه قد يتلوّث بالأحياء الدقيقة. وتحتوي القطرات الأولى من الحليب على أعداد أكثر من الجراثيم، لذلك تُستبعد عندما يُراد الحصول على حليب محتواه الجرثومي منخفض.

٢- **الهواء:** مصدر جيد للتلوث ولاسيما عندما يثار الغبار قبل الحلابة أو في أثنائها، لكنَّ ذلك لا يتعدى إضافة بضعة آلاف من الأحياء الدقيقة إلى كل مليلتر حليب.

٣- **جلد الحيوان الحلوب:** يسقط خلال عملية الحلابة بعض المواد الغريبة مثل الروث والتراب من على الجلد وغيرها، فيصل من التراب كثير من أنواع *Bacillus* و *Clostridium* ، ومن الروث أنواع من جنس *Escherichia* و *Clostridium*.

٤- **الآلات والأدوات المستعملة في الإنتاج:** تشمل كل الأجهزة والأوعية التي يُلامسها الحليب مثل أوعية الجمع والمصافي والمبردات والفرازات والزجاجات وأجهزة تعبئتها.

٥- **الحلاب:** قد يكون الحلاب مصاباً بأمراض تنتقل إلى الحيوان السليم، أو تنتقل إلى الحليب نفسه.

٦- **الذباب:** يحمل الأحياء الدقيقة على جسمه وينقلها إلى الحليب، ولاسيما الجراثيم الممرضة.

معايير تصنيف جراثيم الحليب

١- التصنيف القائم على أساس القدرة على إحداث إصابات وأمراض.

٢- التصنيف القائم على استجابتها لدرجات الحرارة (جراثيم مقاومة للبسترة- جراثيم أليفة للبرودة- جراثيم أليفة للحرارة وغيرها).

٣- التصنيف القائم على خصائصها الحيوية الكيميائية؛ حيث نميز المجموعات الآتية:

- جراثيم منتجة للحموض مثل *Lactobacillus*
- جراثيم منتجة للغاز مثل *E.coli*
- جراثيم محللة للبروتينات مثل *Proteus*

- جراثيم محللة للدهون مثل *Pseudomonas*

اختبارات الكشف عن جراثيم الحليب

إن بسترة الحليب أو غلي الحليب تقضي على الخلايا الإعاشية للجراثيم فقط؛ لكنها لا تقضي على أبواغ الجراثيم، كما أنها تقضي على الجراثيم الممرضة مثل السلمونيلة والعصيات السلية والريكتسيا. وإن عملية البسترة تحافظ على القيمة الغذائية للحليب عكس عملية الغلي التي تفقد الحليب جزءاً من قيمته الغذائية. وتتم عملية البسترة بعدة طرائق.

تأتي عمليات الكشف الجرثومي للحليب سواء على الحليب الخام أم الحليب المبستر ليس فقط للتأكد من صلاحيته للشرب؛ وإنما للتأكد من أن الحليب يصلح للتصنيع (تحويله للأجبان والألبان)، أو للتأكد من نجاح عملية البسترة.

ويتم ذلك عادة حسب عدة طرائق منها:

- تقدير عدد الجراثيم بالفحص المجهري المباشر، بفحص قطرة من الحليب بعد تلوينها بأزرق الميتلين (تستعمل لذلك شريحة ميكرومترية)، أو باستعمال صفيحة بتروووف هوسر ومن دون استعمال ملون.
- إحصاء عدد الجراثيم بزرع حجم معين من الحليب في أطباق بتري تحتوي على وسط مغذ مناسب (كشف كمي).
- اختبار الإنزيمات المرجعة، وتسمى بالطريقة غير المباشرة.
- اختبار إنزيم الفسفاتاز، للتأكد من نجاح عملية البسترة.
- اختبار أزرق بروم تيمول، للكشف عن جراثيم التهاب الضرع.
- الاختبار الكيفي لبعض المجموعات الفيزيولوجية باستزراعها في أوساط اصطفائية.
- اختبار الكشف عن الخمائر.

١ – اختبار إحصاء الجراثيم في الحليب باستعمال طريقة الأطباق:

يعد عدد الجراثيم الموجودة في عينة الحليب دليلاً مهماً على ظروف إنتاجه وتداوله وجودته (الحفاظ على الجودة keeping quality) فزيادة عدد الجراثيم بالحليب الخام (الطازج) يدل على تلوثه بدرجة كبيرة عند إنتاجه وتداوله أو عدم تبريده، قد يحتوي الحليب على عدد مرتفع نسبياً من الجراثيم دون أن يظهر عليه أي تغير غير طبيعي، ويرجع سبب ذلك إلى أهمية وجود الجراثيم بأعداد كبيرة (تزيد على مستوى معين) لإظهار التغيرات غير الطبيعية. ولنوع الجراثيم ومصادرها أهمية بالغة في تحديد نوع الفساد، فمثلاً وجود الجراثيم العصوية المتبوغة، وكذلك جراثيم القولون (مجموعة الكوليفورم Coliform) يدل على تلوث الحليب بالتربة عند الإنتاج.

ملاحظة: إن عدد جراثيم القولون المسموح بها حسب المواصفات السورية هي خمس خلايا جرثومية في ١مل فقط. وأكثر من ذلك يعد الحليب ملوثاً بالبراز وذلك للحليب المبستر والخام معاً.

– لا تنمو جميع الأحياء الدقيقة الموجودة في الحليب بسوية واحدة بدرجة حرارة معينة، لذلك اعتمدت طريقة موحدة باستعمال درجة حرارة معينة ووسط زرعي مناسب لتقدير أعداد الجراثيم التي تنمو في هذه الظروف.

الأدوات والمواد اللازمة:

– عينات من الحليب الخام أو المبستر المراد اختباره.

– أطباق بتري معقمة فارغة، ماصات معقمة.

– ٦ أنابيب اختبار مرقمة من ١ إلى ٦ في كل منها ٩مل من الماء المقطر المعقم، أو من المحلول الفيزيولوجي المعقم (محلول ملحي تركيزه ٨.٥– ٩/١٠٠٠).

- حمام مائي.
- وسط عد جرثومي، مثل الآغار المغذي Nutrient Agar.

طريقة العمل:

١- ضع دورَق وسط الاستزراع في الحمام المائي حتى يسيل (يتميع أو يصهر) Liquidize ثم برده حتى درجة حرارة ٤٥°م، (احفظه بهذه الدرجة من الحرارة لحين الاستعمال).

٢- رج عينة الحليب نحو ٢٥ مرة، ثم اعمل منها التمديدات تحت ظروف التعقيم من (١/١٠ ، ١/١٠٠، حتى ١/١٠٠٠٠٠٠٠) باستعمال الماء المقطر أو المحلول الفيزيولوجي المعقم، بأخذ مقدار ١ مل من عينة الحليب وإضافته إلى الأنبوب رقم ١ الذي يحوي على مقدار ٩ مل من الماء المقطر المعقم، ثم أدر الأنبوب بين راحة الكفين لتمام مزج الحليب بالماء فنحصل على التمديد ١/١٠ أو $١٠^{-١}$.

٣- انقل بوساطة ماصة معقمة أخرى مقدار ١ مل من التمديد ١/١٠؛ أي من الأنبوب رقم ١ إلى الأنبوب رقم ٢ وامزج جيداً بين الكفين فتحصل على التمديد ١/١٠٠ أو $١٠^{-٢}$.

٤- كرّر ما سبق حتى تصل إلى التمديد ١/١٠٠٠٠٠٠٠ أو $١٠^{-٦}$ مع مراعاة استعمال ماصة معقمة جديدة في كل مرة، ومراعاة شروط التعقيم وعملية التجانس عن طريق المزج الجيد بين راحة الكفين.

٥- انقل مقدار ١ مل لماصة معقمة من كل تمديد إلى الطبق المقابل (الشكل ٢٢) ورقّم الأطباق مع تسجيل التركيز، وتاريخ الزرع، واسم الطالب (يمكن عمل مكررات على التراكيز).

٦- صب مقداراً من الوسط الزرعي (نحو ٢٠- ٢٥ مل) في كل طبق (سماكة ½ سم في كل طبق) بحيث يكون الوسط مصهوراً بدرجة حرارة ٤٥°م مع مراعاة شروط التعقيم، ثم حرّك الطبق جيداً حتى يمتزج الوسط مع مقدار ١ مل من التخفيفات السابقة ويتم التوزيع بانتظام.

٧- اترك الوسط حتى يبرد ويتصلب، ثم اقلب الأطباق واحضنها بعدئذ في الحاضنة بدرجة حرارة قدرها ٣٧م° فترة تحضين قدرها ٢٤- ٤٨ ساعة.

٨- أخرج الأطباق من الحاضنة وعد المستعمرات الجرثومية Colonies أو ما يسمى (Colony forming unit CFU)، حيث تُعدّ الأطباق التي تحتوي على عدد يتراوح ما بين ٣٠ -٣٠٠ مستعمرة.

٩- احسب عدد الجراثيم في المليلتر الواحد (١سم^{٣}) من الحليب بتطبيق المعادلة:

$$\text{عدد الجراثيم في ١ مل} = \frac{\text{عدد المستعمرات في المكررات} \times \text{مقلوب نسبة التخفيف}}{\text{حجم العينة}}$$

أو سجل النتائج في جدول (الجدول 5)

الجدول 5. تسجيل نتائج عد الجراثيم

نسبة التخفيف	(١/١٠٠.٠٠٠)10^{-5}		(١/١٠٠٠.٠٠٠)10^{-6}
عدد المكررات	١	٢	١ ٢
عدد المستعمرات			
متوسط عدد المستعمرات			
×مقلوب نسبة التخفيف			
الوسطي			

يجب الانتباه إلى اتباع التعليمات الآتية في أثناء العمل:

١- تؤخذ ماصة معقمة في كل مرة.

٢-عدم لمس فوهة الوعاء الحاوي على الحليب المراد فحصه خوفاً من التلوث، ويستحسن تمرير الماصة بلطف على اللهب مع عدم تعريضها للحرارة العالية كيلا تُكسر.

٣- عدم غطس الماصة أكثر من ٣ سم في العينة.

٤-عند عمل تخفيف في أنبوبة تخفيف جديدة تعاد عملية الخض حتى نضمن تجانس العينة.

٥- عند وضع الحليب في أطباق بتري يجب عدم رفع الغطاء المعقم نهائياً ووضعه على المنضدة بعيداً عن الطبق، وإنما اتباع الطريقة الصحيحة لذلك.

مناقشة النتيجة:

أولاً – الحليب المبستر:

يصنف هذا الحليب تبعاً لعدد الجراثيم الموجودة فيه كالآتي:

١- ذو نوعية جيدة جداً عند احتوائه أقل من ٣٠.٠٠٠ خلية في ١ مل.

٢- ذو نوعية جيدة عند احتوائه ٣٠.٠٠٠ – ١٠٠.٠٠٠ خلية في ١ مل.

٣- ذو نوعية أقل من عادية عند احتوائه ١٠٠.٠٠٠-٢٠٠.٠٠٠ خلية في ١ مل.

٤- ذو نوعية رديئة عند احتوائه أكثر من ٢٠٠.٠٠٠ خلية في ١ مل.

ثانياً- بالنسبة للحليب الخام:

يُعدُّ الحليب الخام الذي يحتوي ٥٠٠.٠٠٠ جرثومة /١ مل حليباً مقبولاً، لكن العدد الكلي للجراثيم ليس مهماً بدرجة الأهمية نفسها لنوعية الجراثيم.

من عيوب هذه الطريقة:

١- قد تشترك أكثر من خلية في تشكيل المستعمرة الجرثومية.

٢- بعض الجراثيم لا يظهر على هيئة مستعمرات يمكن عدّها؛ لأن الظروف غير ملائمة لنموها وتطورها.

٣- طريقة تحتاج وقتاً طويلاً.

٤- لا تنمو جميع الأحياء الدقيقة الموجودة في الحليب بسوية واحدة.

إذاً نلاحظ دوماً أن العدد الذي نقرؤه أقل بكثير من العدد الحقيقي، ولكن رغم هذه الأخطاء فإن هذه الطريقة الموحدة المتبعة باستعمال درجة حرارة معينة؛ ووسط زرعي معين ومناسب لتقدير أعداد الجراثيم التي تنمو في هذه الظروف، هي طريقة معترف بها.

٢- اختبار الإنزيمات المرجعة:

تعد اختبارات الإرجاع من الطرائق غير المباشرة لتقدير الحمل الجرثومي (تقدير كمية الجراثيم في الحليب)، كما تُعطي فكرة جيدة عن نظافة الحليب.

مبدأ الطريقة:

إن تكاثر الجراثيم في الحليب يؤدي إلى استهلاك نسبة عالية من الأكسجين؛ الأمر الذي يؤدي إلى انخفاض في كمون الأكسدة والإرجاع يتناسب مع عدد ونوعية الجراثيم.

ويمكن عملياً الكشف عن هذا التغيير في كمون الأكسدة والإرجاع باستخدام صبغات زرقة المثلين أو الريزازورين Resazurin؛إذ إن الصيغة المؤكسدة لهذين الملونين تكون باللون الأزرق وتكون الصيغة المرجعة عديمة اللون، وتتناسب المدة اللازمة عادة لزوال اللون عكساً مع عدد الجراثيم في عينة الحليب.

اختبار إرجاع لون أزرق الميتلين Methylene blue reduction test :

يمكن تحديد درجة جودة الحليب ونوعيته عن طريق اختبار إرجاع ملون زرقة المتلين، والزمن اللازم لهذا الإرجاع؛ إذ يتوقف هذا الزمن على عدد الجراثيم النشيطة الموجودة في الحليب، فإذا ما ارتفع عددها فإنها تحتاج إلى كمية أكبر من غاز الأُكسجين، وبذلك يُرجع لون الملون (الصبغة) في وقت أسرع.

يكون لون زرقة المتلين أزرق في حالته المؤكسدة، لكنه يصبح عديم اللون عندما يستقبل الهيدروجين (عندما يرجع)، وتُبين سرعة إرجاع اللون مدى سرعة عمليات الأكسدة. وإذا حدثت عملية إرجاع زرقة المِتلين في وجود الهواء، أو إذا حُرر تيار من الهواء، فإن ذلك يعمل على إعادة أكسدة الملون وعودته إلى اللون الأزرق مرة ثانية.

ويعود إرجاع لون زرقة المِتلين إلى نشاط إنزيمات الأكسدة (النازعة للهيدروجين Dehydrogenases في وجود مواد التفاعل العضوية المختلفة).

يُلخص هذا الاختبار بإضافة كمية معلومة من الملون إلى الحليب؛ ويجري تحضينه بدرجة حرارة قدرها ٣٧م° ثم ملاحظة تغير اللون في الحليب في أزمنة متفاوتة. وهكذا فلون زرقة المِتلين سيُرجع في زمن قصير بحالة الحليب ذي النوعية الرديئة وبعكس الحليب ذي النوعية الجيدة، فإن الزمن اللازم لاختزال هذا الملون يكون طويلاً.

الأدوات والمواد اللازمة:

- عينة الحليب المراد فحصها.
- أنابيب اختبار فارغة ومعقمة.
- ماصات معقمة.
- صبغة زرقة المِتلين ١/٢٠٠٠٠٠ المحضرة حديثاً؛ والمحفوظة في البرودة

والظلام.

- حمام مائي بدرجة حرارة (٣٧م).

طريقة العمل:

١- اخلط عينة الحليب جيداً، ثم انقل مقدار ١٠ مل بماصة معقمة إلى أنبوب اختبار معقم.

٢- أضف مقدار ١ مل من محلول أزرق الميتلين ١/٢٠٠٠٠٠٠ المحضر حديثاً؛ والمحفوظ في البرودة والظلام إلى عينة الحليب الموجودة في الأنبوب.

٣- رج الأنبوب جيداً للحصول على مزيج ذي لون أزرق واضح ومتجانس (يمكن عمل عدة أنابيب).

٤- ضع الأنابيب في حمّام مائي بدرجة حرارة ٣٧ م° بالضبط؛ وحيثما تصل درجة عينة الحليب إلى٣٧ م° بالضبط باشر بتسجيل الزمن. ويجب مراعاة وضع الأنابيب بحيث يكون سطح الماء في الحمام المائي أعلى من سطح عينات الحليب داخل الأنابيب مع مراعاة إبعاد الضوء عن الأنابيب في الحمام المائي عن طريق تغطيته بغطاء خاص.

٥- راقب الأنابيب داخل الحمام المائي بمعدل كل ١٥-٢٠ دقيقة، وسجل الزمن الذي يزول عنده اللون الأزرق، ارفع الأنابيب التي يزول لونها من الحمام، أما تلك التي لم يتغير لونها فتقلب مرة واحدة وتعاد إلى الحمام المائي، والأنابيب التي قد تغير لونها جزئياً؛ تعاد إلى الحمام دون أن تقلب.

يلاحظ أن الوقت الذي يُرجع فيه لون زرقة المِتلين يتناسب عكسياً مع العدد الكلي للجراثيم في عينة الحليب، فكلما كان عدد الجراثيم كبيراً كانت المدة اللازمة لإرجاع أزرق الميتلين قصيرة.

يمكن تحديد جودة عينة الحليب الخام بالاستعانة بالجدول 6.

جدول رقم 6 تحديد جودة عينة الحليب الخام

سرعة زوال (اختفاء)اللون	عدد الجراثيم في ١ مل تقريباً	جودة الحليب
٢٠ دقيقة أو أقل	أكثر من ٢٠ مليون	A سيء جداً
من ٢٠ دقيقة حتى ساعتين	بين ٤-٢٠ مليون	B سيء
من ساعتين حتى خمس ساعات ونصف	٥٠٠٠٠٠ إلى ٤ ملايين	C متوسط
من خمس ساعات ونصف حتى ٧ ساعات	٥٠٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠٠	D جيد
أكثر من ٧ ساعات	أقل من ١٠٠٠٠٠	E جيد جدا

كيفية تحضير محلول ملون أزرق الميتلين:

نحل ٠.٠٥ غ من صبغة زرقة المِتلين (٩٠% صبغة) في ١٠٠٠ مل من الماء المُقطّر.

الفصل الثامن

استزراع الجراثيم اللاهوائية المجبرة
Culturing of Bacteria

دراسة الجراثيم اللاهوائية:

تشمل الدراسة زرع هذه الجراثيم وعزلها وتحديد نوعيتها بدءاً من بيئتها الطبيعية. وبما أن هذه الجراثيم لا هوائية مجبرة فيجب أن تنمو في بيئات خالية تماما من الأكسجين، لذلك يعمد إلى نزعه من الوسط بوسائط عدة.

الوسائط المستعملة لنزع الأُكسجين من أوساط الاستزراع:

الغاية من ذلك نزع الأُكسجين الحر من الأوساط الزرعية بوسائل مختلفة.

1- **الوسائل الفيزيائية:** وتتم بوضع الوسط الزرعي في حمام مائي غال مدة 20 دقيقة وهذا ما ندعوه بتجديد الوسط لإخراج الأُكسجين المنحل بالوسط. وفي حالة الوسط السائل نضيف زيت البرافين على السطح لعزله عن الهواء.

2- **الوسائل الكيميائية:** تضاف مواد مرجعة إلى الوسط لتثبت الأُكسجين الحر بعملية الإرجاع، بشرط ألا تعوق هذه المواد نمو الجراثيم مثل حمض البيروغاليك – حمض التيوغليكوليك – السيستئين – حمض الأسكوربيك.

ويفضل عادةً زرع الجراثيم اللاهوائية على أوساط تحتوي الغلوكوز؛ لأن إضافة الغلوكوز إلى وسط قلوي سيؤدي عند وضع الوسط في حمام مائي غال إلى تحرر بعض المواد المرجعة التي تساعد على النمو اللاهوائي.

3 – **الوسائل الحيوية:** بإضافة أجزاء من الأعضاء أو النسج أو الدم أو المصل بصورة عميقة إلى الأوساط الزرعية (مثلاً إضافة جزء من الكلية أو الكبد توضع في وسط يحتوي المرق المغذي).

الطرائق المستعملة في زرع الجراثيم اللاهوائية:

1- طريقة الزرع العميق: يجري الزرع في أنابيب أو ضمن الأطباق.

2- طريقة الزرع على السطح: تستعمل الأوساط السابقة نفسها، لكن في أطباق بعد نزع الأكسجين من الوسط ويتم الزرع على السطح والحضن في شروط لاهوائية، وفق نُظُم مختلفة نذكر منها:

أ – استعمال البيروغالول Pyrogallol: مسحوق قلوي، حيث نضع برشامة تحوي 2 غ منه على السطح الخارجي لغطاء الطبق، ثم نضع الغطاء فوق العلبة بوضع مقلوب، ونثبت الغطاء على العلبة بشريط لاصق (الشكل ٣٠).

الشكل 30 استعمال برشامة البيروغالول في الطبق.

كما أنه يمكن استعمال البيروغالول مع أنابيب الآغار المائل (الشكل ٣١):

الشكل 31 استعمال البيروغالول في الأنبوب.

ب – **استعمال الجرة اللاهوائية:** وعاء معدني أو بلاستيكي مُحكمُ الإغلاق، ويمكن جعل الوسط داخل الجرة لاهوائياً كالآتي:

- **طريقة توليد الغاز:** (الشكل ٣٢) نستعمل ظرفاً مغلقاً مجهزاً تجارياً يستعمل مرة واحدة يحتوي مضغوطتين: إحداهما حمض الستريك مع بيكربونات الصوديوم لإطلاق غاز ثنائي أكسيد الكربون، والثانية بورهيدرات الصوديوم.

نضع الظرف + الأطباق + ١٠ مل ماء عادي داخل الجرة ثم تغلق. يحدث التفاعل، فينطلق غاز ثنائي أكسيد الكربون من المضغوطة الأولى وغاز الهيدروجين من المضغوطة الثانية، وبوجود وسيط البلاديوم يتفاعل الهيدروجين

الشكل 32 الجرة اللاهوائية

مع الأكسجين ليعطي الماء خلال 15 – 30 دقيقة (إن غاز ثنائي أكسيد الكربون ضروري لنمو الجراثيم اللاهوائية ولا يدخل في التفاعل)، علماً بأنه تم حالياً تجهيز ظروف تجارية لا تحتاج إضافة أي شيء آخر إلى الجرة.

نضيف شريطاً مشعراً من زرقة المتلين عادةً الذي يزول لونه عند غياب الأكسجين، للتأكد من خلو الجرة من الأكسجين. يحتاج زوال لون المشعر 5 –6 ساعات، أما انخفاض نسبة الأكسجين إلى أقل من 1% فيحتاج إلى نصف ساعة، بعدها فقط نضع الجرة في الحاضنة.

ملاحظة: يفقد وسيط البلاديوم فعاليته نتيجة الرطوبة وكبريت الهيدروجين الناتج عن الجراثيم ونواتج الاستقلاب الجرثومية الأخرى، لذلك يجب إعادة تنشيطه بعد كل استعمال بتسخينه في فرن جاف لمدة ساعتين بدرجة 170°م وحفظه في مكان جاف لحين الاستعمال.

ملاحظة: يجب ترك الجرة اللاهوائية مدة 2/1 ساعة في درجة حرارة الغرفة قبل وضعها في الحاضنة، لأن الأُكسجين مازال موجوداً، وسيكون شديد السمية على اللاهوائيات في أثناء انقسامها وتكاثرها.

- **طريقة التخلية والاستبدال:** تجري عن طريق تزويد الحجرة بصمامات تسمح بتخلية الهواء واستبداله بمزيج لاهوائي من الآزوت بنسبة 85% والهيدروجين بنسبة 10% وغاز ثنائي أكسيد الكربون بنسبة 5%.

جـ – طريقة المحفظة الحيوية: محفظة بلاستيكية تتسع لعدد من الأطباق شفافة غير نفوذة للغاز نضع في داخلها ظرفاً تجارياً للتخلص من الأُكسجين، تغلق بإحكام (يمكن لحمها بالحرارة) رخيصة الثمن ويمكن مراقبة النمو داخلها دون فتحها (الشكل ٣٣).

الشكل 33 المحفظة الحيوية.

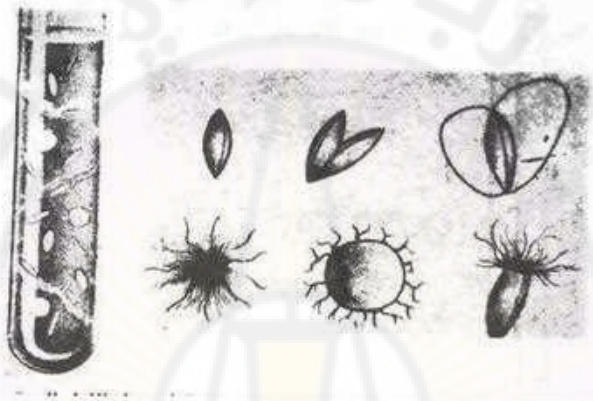
دراسة أشكال المستعمرات النامية لاهوائياً:

في حالة الزرع العميق يمكن تصنيف أشكال المستعمرات في نموذجين:

آ – **أشكال منتظمة:** عدسية الشكل بسيطة أو قلبية أو وريقة ثنائية أو ثلاثية (الشكل34)، وهي مستعمرات لا تمْلك إنزيمات الغالاكتاناز Galactanase التي

تفكك مادة الغالاكتان الموجودة في الآغار ومِنْ ثَمَّ تبقى المستعمرات في مكانها دون أن تنتشر.

ب – أشكال غير منتظمة: تكون أشكال المستعمرات مختلفة مدورة أو غير منتظمة أو متفرعة كالأغصان، وهذه مستعمرات لجراثيم تمتلك إنزيمات الغالاكتاناز التي تفكّك الآغار وتتشعب مكان الآغار المتفكّك.



الشكل 34 أشكال المستعمرات في حال الزرع العميق.

– هذه المستعمرات تكون أحياناً شفافة أو عاتمة – بيضاء أو ملونة. ولكن أحياناً عندما نزرع هذه الجراثيم في العمق، فإنها تطلق فقاعات غازية تعوق رؤية أشكال هذه المستعمرات، وهذا من مساوئ طريقة الزرع العميق.

أما في حال الزرع على السطح فإنها تعطينا مستعمرات مماثلة لمستعمرات الجراثيم الهوائية وأحياناً مستعمرات من النموذج الخشن أو من النموذج الأملس.

الفصل التاسع

الفحص المجهري للجراثيم
Microscopic observing of Bacteria

إن صغر حجم الجراثيم يُحتمّ علينا فحصها بالمجهر، وذلك بعد تحضير العينات بدقة وعناية.

الفحص المجهري للمحضرات الجرثومية

من أجل رؤية الجراثيم لابد من تكبيرها من 600 – 1000 مرة، ولفحص المحضر المهيأ والملون بالمجهر نستعمل العدسة الغاطسة التي تميّز من غيرها من العدسات بوجود إطار أسود في نهايتها السفلية، وعند الفحص نضع على اللطاخة الملونة قطرة من زيت الأرز عوضاً عن استعمال الساترة.

وعند استعمال المجهر نرفع المكثف إلى الأعلى مع فتح الحظار كاملاً. نضع الصفيحة على اللوحة ونثبتها بالقابضين، ونفحص بالتكبير 40 أو60 أولاً حتى وضوح الرؤية ثم ندير على العدسة الغاطسة، ونضبط الرؤية بلولب الإحكام البطيء. أو نترك العدسة الغاطسة حتى تلامس قطرة الزيت، وبعد ذلك ننظر من العدسة العينية، ونحرك اللولب لرفع العدسة الغاطسة من الأسفل إلى الأعلى حتى ظهور معالم المحضر، ثم نجري المطابقة باللولب الصغير (البطيء).

وبعد إنهاء الفحص لابد من مسح قطرة زيت الأرز عن سطح العدسة الغاطسة، ويتم ذلك بقطعة من القطن مبللة بالزيلول (غول الخشب).

– الفحص المجهري للجراثيم، يتم إما مباشرة بالحالة الحية أو بعد إجراء عملية

التثبيت والتلوين لها.

١- الفحص المباشر

يجرى هذا الفحص على الجراثيم الحية غير الملونة والهدف منه التحري عن وجود الجراثيم وتقدير عددها الأوليّ في العينة المدروسة، باستعمال صفائح خاصة مثل صفيحة بتروف هوسر Petroff – Hausser (راجع فقرة تقدير عدد الخلايا الميكروبية في عينة ما)، ودراسة شكلها الخارجي وحجمها وطريقة تجمعها إن أمكن ، والأهم من ذلك هو دراسة حركتها.

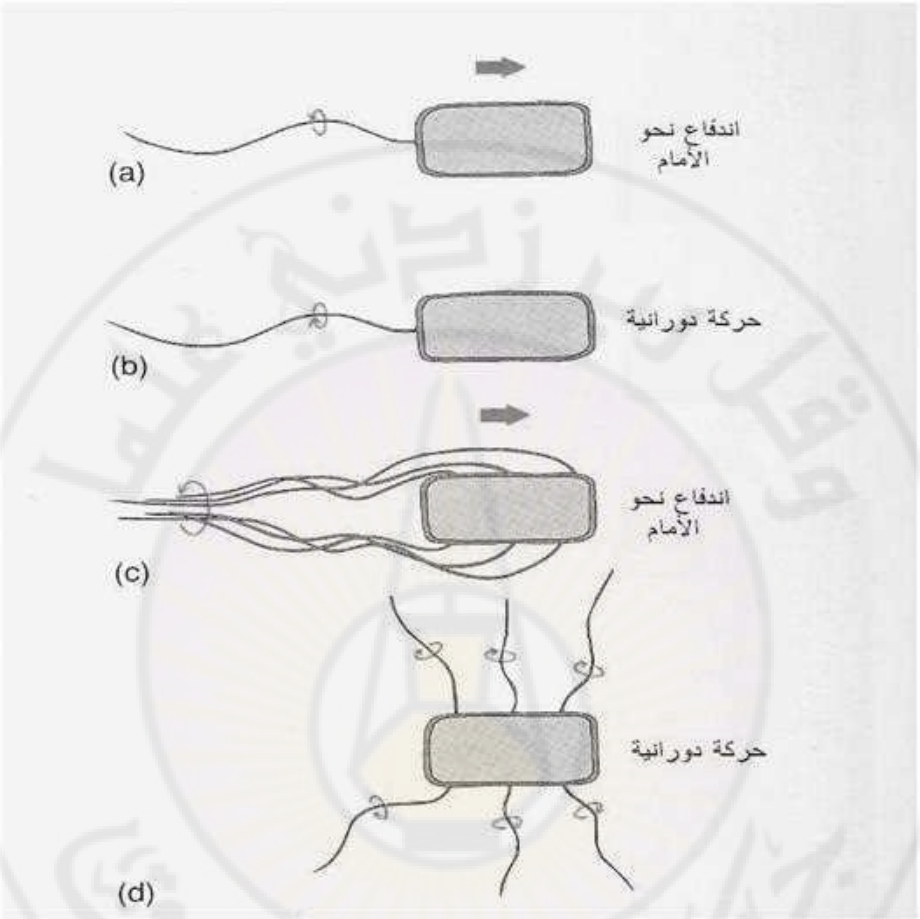
_ دراسة الحركة عند الجراثيم:

يجب التفريق بين الحركة الحقيقية الناتجة عن وجود السياط حيث تندفع الجراثيم كالسهم بحركة مستقيمة أو دورانية انقلابية، وهذا يعود لتوزع السياط في الخلية الجرثومية (الشكل ٣٥)، وبين الحركة الكاذبة الناتجة إما عن جذب السائل؛ إذ تنجذب جميع الجراثيم بالاتجاه نفسه بسبب حركة السائل، أو عن الحركة البروانية الناتجة عن اصطدام الجراثيم بجزيئات السائل الموجودة فيه؛ مما يجعلها تهتز بسرعة دون أن تنتقل من مكانها.

يجرى هذا الفحص في **القطرة المعلقة Hanging drop**.

الأدوات والمواد اللازمة :

- صفائح زجاجية مجوفة (صفائح ذات الحفرة).
- ساترات زجاجية.
- فازلين.
- مزارع جرثومية سائلة عمرها 18- 24 ساعة.



الشكل 35 نمط الحركة عند الجراثيم

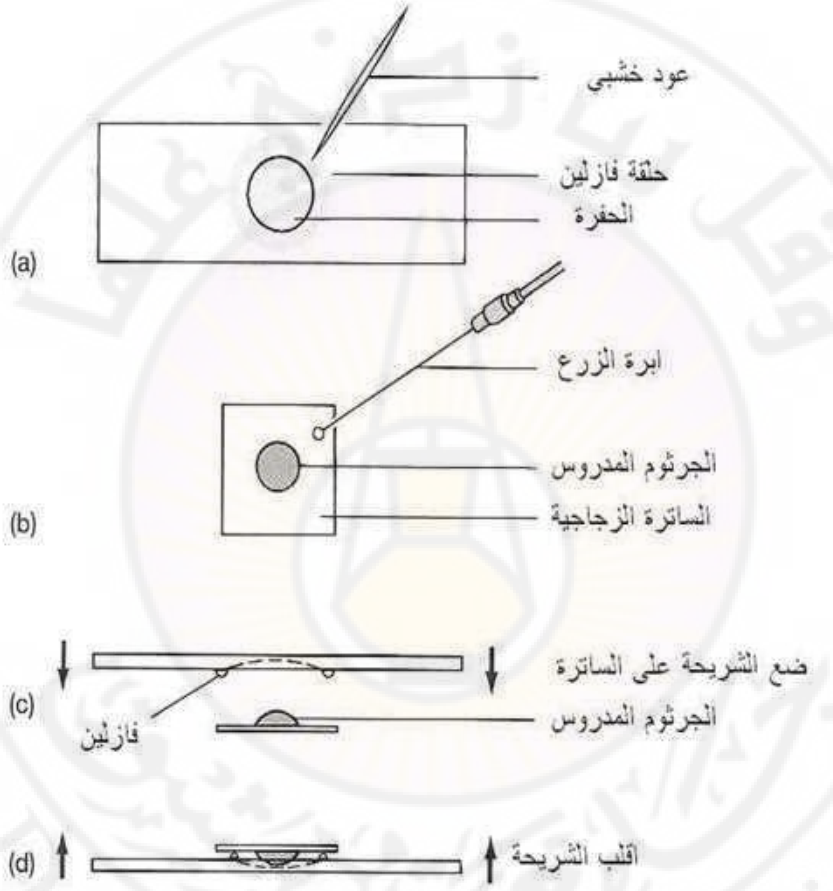
طريقة العمل (الشكل٣٦):

1- نظف الصفيحة الزجاجية جيداً، ونظف الساترة.

2- ضع بوساطة قضيب زجاجي قليلاً من الفازلين حول تجويف الصفيحة

(الحفرة) أو على أطراف الساترة.

3- ضع قطرة صغيرة من المزرعة الجرثومية في منتصف الساترة الزجاجية بإبرة التلقيح.



الشكل 36 آلية إجراء القطرة المعلقة

4- ضع الصفيحة على الساترة بحيث تكون قطرة المزرعة في وسط حفرة الصفيحة؛ فتلتصق الساترة بالصفيحة بسبب وجود الفازلين (وظيفة الفازلين لصق الصفيحة بالساترة من جهة ومنع جفاف المحضر من جهة أخرى).

5- اقلب الصفيحة باحتراس، ولاحظ بقاء القطرة معلقة على الساترة.

6- افحص تحت المجهر (مجهر الحقل المظلم) بالتكبير الضعيف أولاً ثم بالتكبير القوي.

7- دوّن ملاحظاتك.

إذا كان المحضر نظيفاً والمجهر كذلك فإنك تستطيع التفريق بين الجراثيم المتحركة وغير المتحركة وتمييز طريقة الحركة.

٢- الفحص بعد التثبيت والتلوين

الهدف من فحص الجراثيم بعد تلوينها هو تسهيل رؤيتها ودراسة شكلها وحجمها واصطفافها ودراسة صفاتها الخلوية الخارجية التي لا يمكن تمييزها عادة بالفحص المباشر (كرؤية السياط أو المحفظة).

كما أنه بالتلوين يمكن معرفة الخواص التلوينية للخلية الجرثومية التي تفيد في معرفة هوية الجراثيم (مثال ذلك طريقة غرام التي تميز بين نمطين من الجراثيم- ودراسة مقاومة الجراثيم للكحول والحمض).

قبل أن نعرض طرائق التلوين يجب أن نأخذ فكرة بسيطة عن الملونات وطبيعتها.

طبيعة الملونات:

الملونات هي مواد صباغية تلوّن الجراثيم، ويكون هذا التلوين:

– إما بالتصاق المادة الملونة وترسبها على الجراثيم (على سطح الخلية الجرثومية) ومن أمثلة الترسيب عملية التفضيض بأملاح الفضة، أو الامتزاز على سطح الخلية؛ وهذا ما يسمى بالتلوين السلبي Negative staining

– أو بدخول هذه الملونات عبر الجدار الخلوي الجرثومي وتكوين معقدات مع مركباته الكيميائية.

إذاً يكون التلوين إما بطريقة فيزيائية (امتزاز وترسيب)، أو بطريقة كيميائية (اتحادات كيميائية وتشكيل معقدات).

والملونات منها ما هو طبيعي كالهيماتوكسيلين Hematoxyline والحبر الصيني، ومنها ما هو صنعي.

والملونات عموماً هي أملاح يكون فيها أحد الشوارد ملوناً أو تكون معتدلة، فإذا كان الجزء المشحون إيجابياً هو حامل اللون مثال أزرق المِتلين:

$$MBC \rightarrow \text{Methylene blue}^{+} + Cl^{-}$$

فإن زرقة المتلين هي ملح كلوري لزرقة المتلين يكون الجزء المشحون إيجابياً هو حامل اللون، ويؤدي الاختلاف في الشحنة إلى اكتساب الخلايا الجرثومية لهذا الملون؛ إذ إن هذه الخلايا تكون ذات شحنة سلبية عندما توجد في وسط ذي pH قريب من الاعتدال، وتحصل عملية التلوين باتحاد زرقة المِتلين إيجابي الشحنة مع الخلايا ذات الشحنة المعاكسة. إن الملونات المشابهة لزرقة المِتلين والتي يكمن اللون فيها في الجزء إيجابي الشحنة تدعى بالملونات القلوية ومن أمثلتها الفوكسين – الزعفران – بنفسجية الجانسيان (البلّورات البنفسجية).

أما الملونات التي يكون الجزء الملون فيها هو المشحون سلبياً أي الشاردة السلبية

هي حاملة اللون، فتُسمى الملونات الحمضية، ومثالها الإيوزين المستعمل بصيغة إيوزينات الصوديوم ويتشرد إلى $Eosinate^- + Na^+$

ومن أمثلة الملونات الحمضية أيضاً حمض المر.

وهناك ملونات معتدلة مثل إيوزينات زرقة المِتلين.

عموماً تصطفي النواة الملونات الأساسية وتصطفي الهيولى الملونات الحمضية.

تحضير النموذج للتلوين: أي تحضير الغشاء الجرثومي (اللطاخة) (الشكل٣٧)، ويكون إما ابتداءً من مستعمرة نامية على وسط صلب، أو من وسط سائل.

-تحضير الغشاء الجرثومي وتثبيته ابتداءً من مستعمرة نامية على وسط صلب:

إن الفحص المجهري للجراثيم الملونة يقتضي قتلها أولاً، وتثبيت الخلايا على الصفيحة الزجاجية ثانياً؛ حتى لا تنجرف هذه الخلايا في أثناء عملية التلوين، ولتحقيق ذلك اعتمدت الطريقة السهلة الآتية:

1- نظف الصفيحة الزجاجية جيداً بمزيج من الكحول وحمض كلور الماء HCl بنسبة 9 :1.

2- خذ كمية قليلة من المستعمرة الجرثومية الفتية بإبرة البلاتين المعقمة والمبردة ثم ضَعْها في منتصف الصفيحة الزجاجية ضمن قطرة ماء معقم صغيرة الحجم.

3- افرش اللطخة الجرثومية بدلكها بالإبرة بحركة دورانية حتى تشكل غشاءً رقيقاً متجانساً نسميه اللطخة الجرثومية Smear.

4- جفف اللطخة في تيار من الهواء ثم ثبتها بتمريرها ثلاث مرات متتالية فوق اللهب، إن التسخين الخفيف يقتل الخلايا، ويجعلها تلتصق بسطح الصفيحة، ولكن التسخين الزائد يمكن أن يؤدي إلى تخريب بنية الخلية الجرثومية. ويمكن

التأكد من أن حرارة الصفيحة مناسبةٌ بجعلها تلامس ظهر اليد، إذ ينبغي أن تكون دافئة وغير حارقة، تسمى هذه العملية التثبيت Fixation.

5- اغسل الغشاء الجرثومي بعد تثبيته باحتراس بالماء المقطر للتخلص من آثار بعض الأملاح والمفرزات الموجودة في الوسط أو المفرزة من الجراثيم بغية عدم إعاقة وصول الملون إلى الخلية الجرثومية.

ملاحظة: إذا كنا نريد تلوين المحفظة يجب عدم غسْلِ الغشاء الجرثومي بالماء كي لا تذوب المحفظة.

-تحضير الغشاء الجرثومي وتثبيته ابتداءً مستعمرة نامية في وسط سائلة:

1- حرك البيئة السائلة بطريقة الهز.

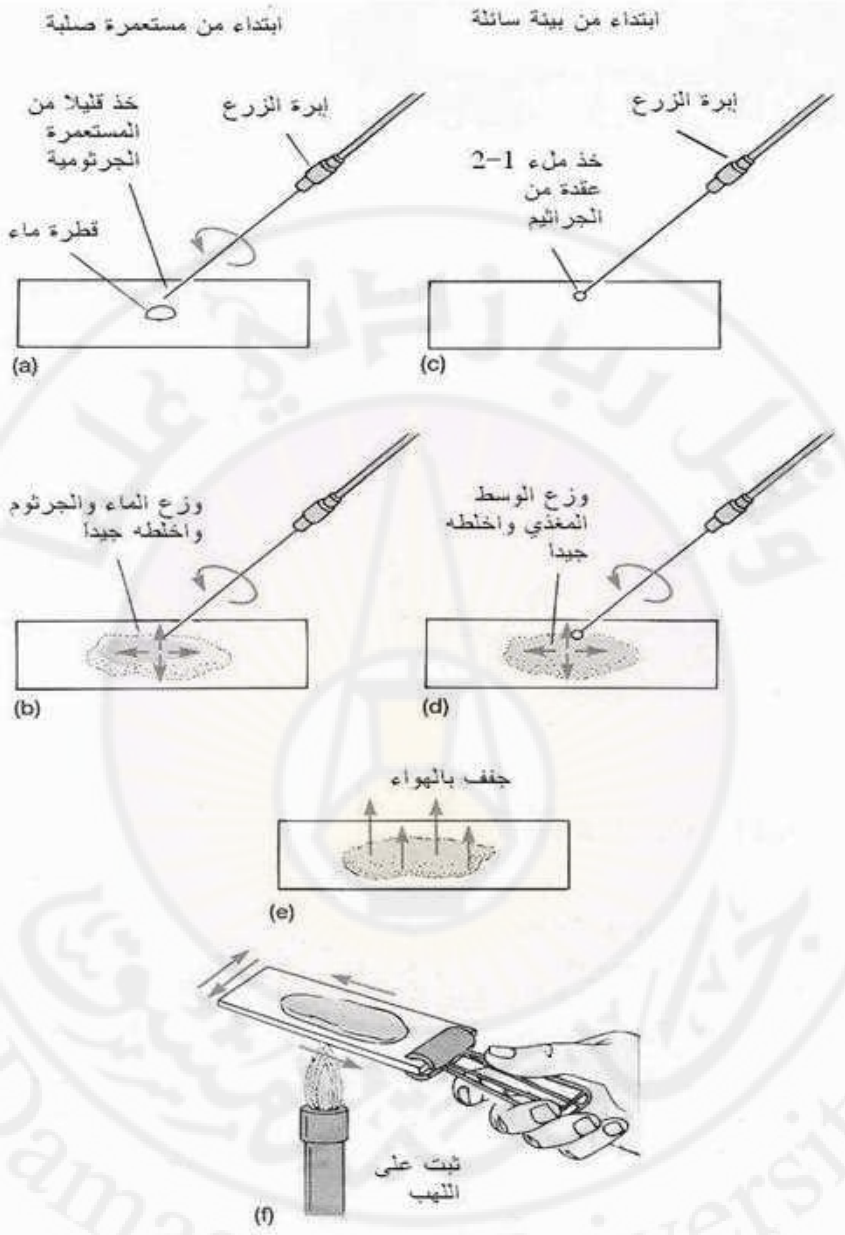
2- عقم الإبرة، وبردها ثم ضع قطرة من المزرعة على سطح الصفيحة الزجاجية، وافرشها بحيث تشكل غشاءً جرثومياً، وفي حال كون المعلق كثيفاً، خفّف المزرعة قبل استعمالها.

3- اترك الغشاء يجف في درجة حرارة الغرفة.

4- ثبت الغشاء بتمرير الصفيحة الزجاجية على اللهب عدة مرات بحيث لا تصل درجة الحرارة الصفيحة إلى درجة يصعب معها لمس الصفيحة باليد.

5- اغسل الغشاء الجرثومي بعد تثبيته باحتراس بالماء المقطر.

ملاحظة: تجرى عملية التلوين عادةً على مستعمرات فتية، لأن المستعمرات الكهلة تغير الكثير من صفاتها.



الشكل 37 آلية تحضير الغشاء الجرثومي.

طرائق التلوين

هناك عدة طرائق لتلوين الجراثيم تختلف باختلاف الأنواع الجرثومية وغاية التجربة. وهي إما بسيطة أو مركبة.

١-**التلوين البسيط Simple staining** : يجري بوضع الملون بتماس مع الغشاء الجرثومي مدة تتراوح بين دقيقة واحدة وعدة دقائق حسب طبيعة وكثافة الملون، فتبدو عندها الجراثيم مصبوغة بلون ذلك الملون.

ويستفاد من هذه العملية بمعرفة وجود الجراثيم أو عدم وجودها، وتحديد شكلها واصطفافها. مثل: التلوين بزرقة المِتلين.

الأدوات والمواد اللازمة

- صفائح زجاجية نظيفة.
- مزارع جرثومية عمرها 24 ساعة موجودة على سطح وسط الآغار.
- صبغة أزرق المِتلين (حضر الصبغة، ورشح المحلول قبل الاستعمال للتخلص من بلورات الملون إن وجدت). (راجع دليل تحضير الصبغات).
- زيت الأرز النقي.

طريقة العمل:

1- حضر الغشاء الجرثومي وثبته بالطريقة السابقة.

2- اغسل الغشاء الجرثومي بتيار خفيف من الماء كيلا تتجرف الخلايا الجرثومية من سطح الصفيحة الزجاجية.

3- ضع على الغشاء قطرة من الملون 2- 3 دقائق ،على أن يغمر الملون الغشاء الجرثومي.

4- أَمِلْ الصفيحة حتى تتخلص من الملون الزائد.
5- اغسل بتيار مائي خفيف بحذر شديد حتى يصبح الماء المنسكب من الصفيحة صافياً؛ أي حتى زوال كامل الملون من على الصفيحة.
6- جفّف الصفيحة بورق النشاف بعناية فائقة أو بتعريضها لتيار من الهواء أو للهب خفيف.
7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء الجرثومي، ثم افحصه بالعدسة الغاطسة.
8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (لون الخلايا – تجمعها – شكلها) مع الرسم.

٢-التلوين السلبي Negative staining : تعدُّ طريقة التلوين السلبي للأغشية الجرثومية ذات أهمية كبرى في تمييز الخلايا الجرثومية، وهو تلوين سهل، تستعمل هذه الطريقة عند الرغبة في قياس حجم الجراثيم حيث تظهر الخلايا بحجمها الطبيعي لعدم استعمال الحرارة مطلقاً في أثناء إجراء الصبغ. كما تستعمل لدراسة مظهر الجراثيم.

وتسمى الصبغة السالبة؛ لأنه يتم صبغ الشريحة دون الخلايا الجرثومية، فتظهر الخلايا شفافة غير مصبوغة وتظهر بقية الشريحة ملونة، ويرجع السبب في عدم دخول الصبغة جسم الخلية هو أن الصبغة المستعملة تكون ذات جزيئات كبيرة لا تنفذ خلال الجدار الخلوي مثل الحبر الهندي (الصيني)، أو تكون صبغات حمضية عديمة أو قليلة التأثير في الخلايا الجرثومية (بمعنى آخر يتم التلوين السلبي عن طريق ترسيب الملون أو امتزازه على الخلايا أي بالطرائق الفيزيائية).

طريقة التلوين السلبي (الشكل ٣٨):

1- ضع جزءاً من مستعمرة جرثومية على طرف صفيحة نظيفة باستعمال إبرة زرع

معقمة.

2- ضع فوق جزء المستعمرة المنقول قطرة أو اثنتين بالإبرة من أحد الملونات المراد استعمالها مثل النيغروسين Nigrosin أو الحبر الهندي (الصيني) أو محلول الإيوزين، وامزجها مع الجراثيم جيداً.

3- افرش المعلق على كامل الصفيحة باستعمال ساترة. حيث توضع الساترة على مكان المعلق فوق الصفيحة بزاوية 45° بحيث ينتشر المعلق الجرثومي الملون على كامل طرف الساترة الملامس للصفيحة، ثم تفرش بالساترة على كامل الصفيحة مكونة ما يشبه اللطاخة.

4- جفّف اللطاخة بتركها في الهواء. لا تجفف بالحرارة. ادرس المحضر تحت المجهر.

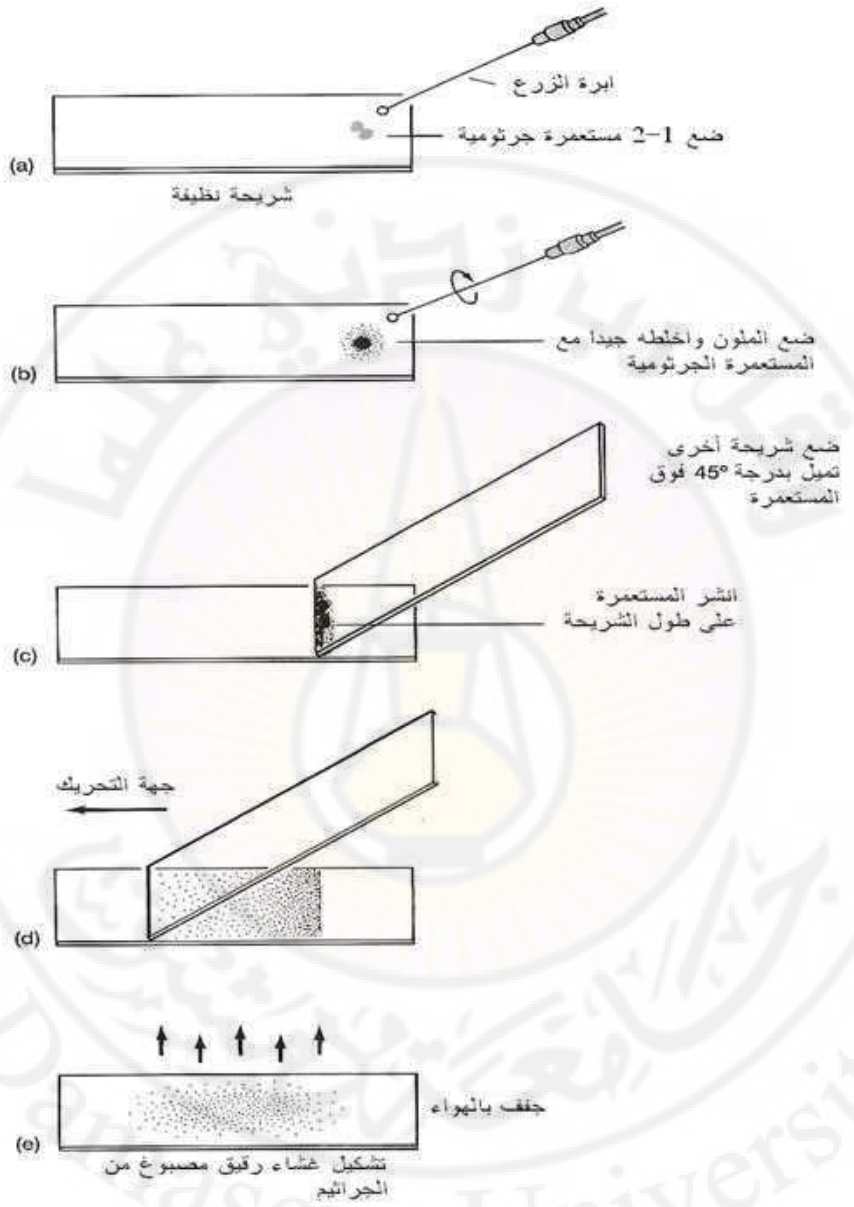
يفيد التلوين السلبي في قياس حجم الخلايا الجرثومية.

٣-التلوين المركب Compound staining : سميت الطريقة بذلك لاستعمال أكثر من ملون واحد فيها، وتتضمن عدة مراحل هي:

1- مرحلة التلوين: يتم فيها وضع الملون المراد استعماله على الغشاء زمناً كافياً.

2- مرحلة الترسيخ: يتم فيها تقوية فعل الملون وتثبيته (تشكيل معقدات أكثر ثباتاً ورسوخاً داخل الخلية) باستعمال محلول لوغول أو حمض الفيني أو حمض الخل أو غيرها حسب الغاية المرجوة.

3- مرحلة التمييز: يتم فيها توضيح العينة بإزالة الملون من بعض الخلايا باستعمال الكحول أو مزيج من الكحول والخلون (الأستون) أو حمض كلور الماء



الشكل 38 آلية التلوين السلبي

و حمض الكبريت أو غيرها حسب الغاية المرجوة.

4- مرحلة التلوين المعاكس: هنا يستعمل الملون المتمم الذي يحمل لوناً مغايراً للون الملون الأساسي المستعمل، حيث تتلون به جميع الجراثيم التي زال منها اللون بعملية التمييز.

من طرائق التلوين المركب:

- **طريقة صبغة غرام Gram staining :**

تعتمد هذه الطريقة تقنية التلوين الاصطفائي حيث تستجيب الجراثيم على نحو مختلف في أثناء عملية تلوينها تبعاً لخصائصها الكيميائية الحيوية ولاسيما التركيب الكيميائي للغلاف الخلوي.

وتعدُّ طريقة غرام في التلوين أكثر الطرائق نفعاً واستعمالاً في مجال تلوين الجراثيم، حيث تمكننا من تمييز مجموعتين مختلفتين من الجراثيم.

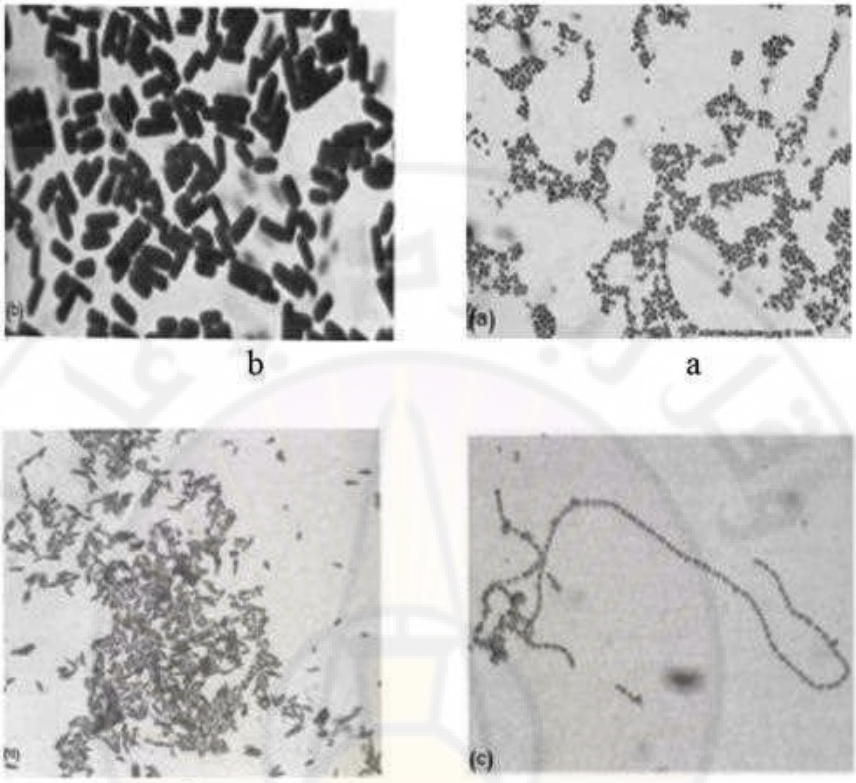
1- جراثيم إيجابية الغرام تحتفظ بلون البلورات البنفسجية، وتبدو بلون بنفسجي تحت المجهر.

2- جراثيم سلبية الغرام تأخذ لوناً زهرياً تحت المجهر (الشكل٣٩).

كما تعطينا هذه الطريقة فكرة جيدة عن سلوك الجراثيم تجاه عدد من العوامل الفيزيائية والكيميائية بما يتضمنه ذلك من تطبيقات مفيدة خاصة في مجال مقاومة الجراثيم الممرضة باستعمال الصادات الحيوية والمركبات الكيميائية المختلفة.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة.



الشكل 39 الجراثيم وقد تلونت بصبغة الغرام.

(a) خلايا *Staphylococcus aureus* موجبة الغرام.

(b) عصيات *Clostridium perfringens* موجبة الغرام.

(c) مكورات *Streptococcus pyogenes* موجبة الغرام.

(d) عصيات *Ecoli* سلبية الغرام .

- محاليل الصبغات: الكريستال البنفسجي، محلول لوغول Lugol (يود البوتاسيوم)، كحول بتركيز 96% أو مزيج متساوي الحجم من الكحول والخلون، الفوكسين أو السفرانين المخفف، (راجع دليل تحضير الصبغات).

- صفائح زجاجية نظيفة.

- زيت الأرز.

طريقة العمل (الشكل ٤٠):

1- حضّر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف.

2- ضع على الغشاء بضع قطرات من صبغة الكريستال البنفسجي مدة 2/1 دقيقة، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة، ثم بحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب.

3- اغمر الغشاء بمحلول لوغول مدة دقيقة واحدة، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة، ثم بحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب.

4- أزل اللون بالكحول الإتيلي 96% لمدة 2/1 دقيقة فقط، ثم اغسلْ بالماء الجاري.

5- اغمر الغشاء بصبغة السفرانين أو الفوكسين مدة دقيقة واحدة أو دقيقة ونصف، ثم تخلص من الصبغة الزائدة بالغسل بالماء مدة 5 ثوان.

6- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء، أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة.

7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً ثم بالعدسة الغاطسة.

8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (من حيث اللون – شكل الخلايا – تجمّعها) مع الرسم.

هناك بعض العوامل التي يمكن أن تؤدي إلى نتائج مغلوطة أو غير واضحة، وأهمها عمر المزارع الجرثومية المستعملة ودرجة حموضة الوسط المستعمل لاستزراعها. وعندما تعترضنا مشكلات من هذا النوع يجب علينا إعادة عملية التلوين أو استعمال مزارع فتية للجراثيم نفسها مع الانتباه لدرجة حموضة وسط الاستزراع.

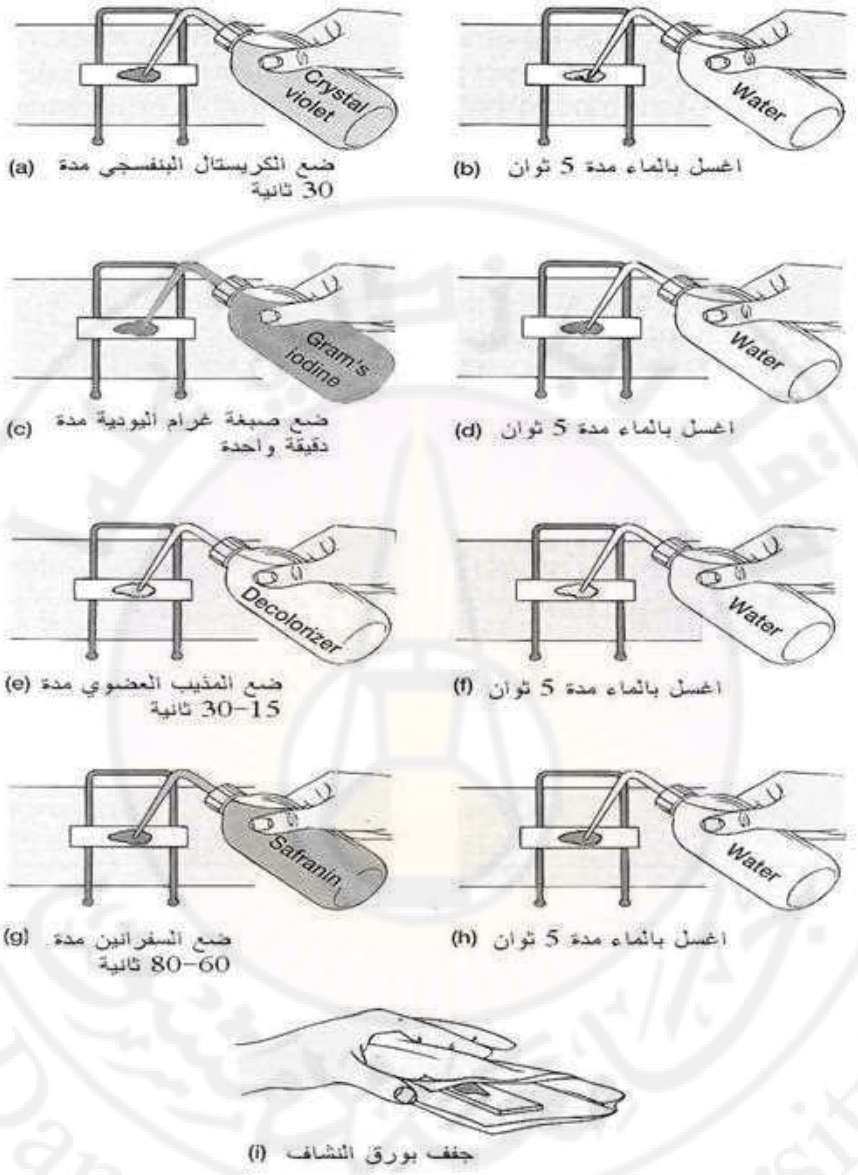
وتجدر الإشارة إلى أنه أجريت تعديلات عديدة على طريقة غرام الأصلية بهدف الحصول على نتائج أفضل وبقي المبدأ واحداً.

التفسير (الشكل ٤١):

ترتبط آلية التلوين بصبغة غرام ارتباطاً وثيقاً بالتركيب الكيميائي للغلاف الخلوي، فهو يرتبط بنفوذية المذيبات الدهنية (كحول – أسيتون) عبر الجدار الخلوي.

بدايةً يتم تلوين جميع الخلايا باللون البنفسجي، وبعد إضافة محلول لوغول يتشكل معقد لونه مائل للسواد داخل الخلايا. وبذلك يكون قد تم ترسيخ اللون، أما عند إضافة الكحول يمكن أن نميز بين نمطين من الخلايا:

النمط الأول: خلايا جدارها الخلوي غني بالدهون حيث يملك نسبة 20% تقريباً، تذوب الدهون بالكحول بسرعة؛ مما يسمح للكحول بالدخول إلى داخل الخلايا، وهذا يؤدي إلى حل المعقد المتشكل بين البلورات البنفسجية ومحلول لوغول وإذابته



(a) ضع الكريستال البنفسجي مدة 30 ثانية

(b) اغسل بالماء مدة 5 ثوان

(c) ضع صبغة غرام اليودية مدة دقيقة واحدة

(d) اغسل بالماء مدة 5 ثوان

(e) ضع المذيب العضوي مدة 15–30 ثانية

(f) اغسل بالماء مدة 5 ثوان

(g) ضع السفرانين مدة 60–80 ثانية

(h) اغسل بالماء مدة 5 ثوان

(i) جفف بورق النشاف

الشكل 40 آلية إجراء تلوين غرام

وخروجه من الخلية، فتصبح هذه الخلايا عديمة اللون وتأخذ اللون الزهري عند إضافة السفرانين أو الفوكسين، وتسمى جراثيم سلبية الغرام ورمزها G^- وأحياناً Gr^-.

النمط الثاني: خلايا جدارها الخلوي فقير بالدهون حيث يمتلك نسبة 2% تقريباً، فلا يستطيع الكحول العبور إلى داخل الخلايا بسهولة ثم تكون كمية الكحول التي تعبر لداخل الخلايا غير كافية لحل المعقد خلال الزمن نفسه من المعالجة؛ مما يؤدي إلى بقاء المعقد داخل الخلايا الجرثومية وتبقى محتفظة بلون البلورات البنفسجية، وتسمى إيجابية الغرام ورمزها G^+ وأحياناً Gr^+.

الشكل 41 المراحل التي تمر بها الخلايا الجرثومية عند التلوين بصبغة غرام

ملاحظة: إن التلوين المعاكس لا يمسُّ إلا الخلايا التي زال لونها بالكحول.

يُعدُّ هذا التفسير الأكثر قبولاً لتفسر آلية (ميكانيكية) تلوين غرام ولكن هناك أكثر من تفسير للآلية منها أنّ الجراثيم ذات الجدران الغنية بالدهون، الكحول يفتح بجدارها فتحات كبيرة الحجم تكفي لخروج المعقد، أما الخلايا ذات الجدران الفقيرة بالدهون فيفتح الكحول بجدارها فتحات صغيرة الحجم لا تكفي لخروج المعقد.

ملاحظة: إن الجراثيم الكهلة قد تغير من خصائصها الخلوية؛ فالجراثيم إيجابية الغرام الكهلة تبدو أحياناً سلبية الغرام.

- **طريقة زيل – نيلسون Ziehl – Nelson :**

تستعمل هذه الطريقة لتلوين الجراثيم المقاومة للحمض Fast Stain acid وبشكل خاص لتلوين عصيات السل *Mycobacterium tuberculosis* وبعض أنواع الشعّيات Actinobacteria التي يصعب تلوينها بالصبغات العادية بسبب احتواء جدرها على مركبات معقدة كالشموع والدهون. وتعتمد هذه الطريقة على مبدأ استعمال درجة مقاومة الجراثيم الملوّنة لفقدانها اللون نتيجة معاملتها بالمواد المذيلة للّون كالحموض والكحول، لتقسيم الجراثيم إلى مجموعتين (الشكل ٤٢):

-الأولى: يزول لونها بسهولة عند معاملتها بمحلول من الحمض والغول.

-الثانية: تتلون بالبداية بصعوبة حيث تحتاج إلى التسخين بوجود صبغ قوي مناسب، ولكنها تحتفظ بلونها بعد ذلك بشدة، إلى حد يصعب معه إزالة هذا اللون بالمذيب السابق. ويتوقف ذلك على طبيعة الجدار الخلوي.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة لجراثيم مقاومة للحمض؛ وأخرى غير مقاومة للحمض للمقارنة.

- محاليل الصبغات الآتية: محلول كربول- فوكسين (محلول زيل)، كحول حمضي، صبغة زرقة المِتلين (راجع دليل تحضير الصبغات).

الشكل 42 مظهر خلايا السل بعد التلوين بطريقة زيل – نلسون
(خلايا السل بلون أحمر وباقي خلايا النسيج بلون أزرق)

- صفائح زجاجية نظيفة.
- زيت الأرز.

طريقة العمل:

1- حضِّر الغشاء الجرثومي وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف.

2- اغمر الغشاء بمحلول كربول - فوكسين، سخّن بلطف فوق سخّان أو فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار، أبعد اللهب قليلاً ثم كرر التسخين عدة مرات بالطريقة نفسها مدة خمس دقائق مع مراعاة عدم غليان الصبغة أو جفافها على الشريحة وإضافتها كلما احتاج الأمر، يمكن الاستعاضة عن التسخين بترك محلول كربول - فوكسين على الغشاء مدة نصف ساعة.

3- اغسل الغشاء بالماء مدة 30 ثانية لإزالة بقايا الملون.

4- اغمر الغشاء بمحلول الكحول الحمضي مدة 10 –30 ثانية، ثم اغسله بالماء جيداً مدة 5 ثوان.

5- أضف محلول زرقة المِتلين مدة 1- 2 دقيقة، ثم اغسل بالماء جيداً مدة 30 ثانية.

6- اترك الغشاء ليجف بتيار من الهواء أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة.

7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً، ثم بالعدسة الغاطسة.

8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (من حيث اللون – شكل الخلايا – تجمّعها) مع الرسم.

التفسير:

عند وضع محلول كربول – فوكسين (الفوكسين القاعدي المذاب بالفينول) على الخلايا مع التسخين نكون بذلك قد قمنا بتلوين الخلايا وترسيخ اللون معاً، ويؤدي هذا إلى تلوين الخلايا باللون الأحمر. وعند إضافة أقوى المزيلات المستعملة وهو الكحول الحمضي (مزيج من حمض كلور الماء والكحول) نلاحظ زوال اللون فقط عند الجراثيم غير المقاومة للحموض، أما الجراثيم المقاومة للحموض فلا يزول منها اللون، وتبقى محتفظة باللون الأحمر. وعند إضافة زرقة المِتلين تتلون فقط الجراثيم غير المقاومة للحمض والتي زال منها اللون الأحمر. وبذلك نستطيع التمييز بين نوعين من الجراثيم: الأول يأخذ اللون الأحمر بتلوين زيل – نيلسون وهو المقاوم للحموض. والثاني يأخذ اللون الأزرق وهو غير المقاوم للحموض.

- **طريقة فونتانا Fontana :**

تستعمل هذه الطريقة لتلوين الجراثيم اللولبية التي لا يمكن تلوينها ورؤيتها إلا بصبغات خاصة ومركبة، ونتبع عادة طريقة ترسيب نترات الفضة على الخلايا الجرثومية اللولبية، فتبدو تحت المجهر بلون بني غامق مائل للسواد.

يظهر الشكل ٤٣ صوراً لبعض الجراثيم اللولبية ملونة بطرائق مختلفة.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية لجراثيم لولبية إن وجدت أو يستعاض عنها بأخذ جزء من قلف الأسنان بقرب اللثة.
- محاليل الصبغات التالية: محلول نترات الفضة 5% ، محلول حمض العفص Tannic acid المركب من الحمض المذاب في 10 مل من الفينول بتركيز 1%. (راجع دليل تحضير الصبغات).
- صفائح زجاجية نظيفة.
- زيت الأرز.

طريقة العمل:

1- حضّر الغشاء الجرثومي، وثبّته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف.

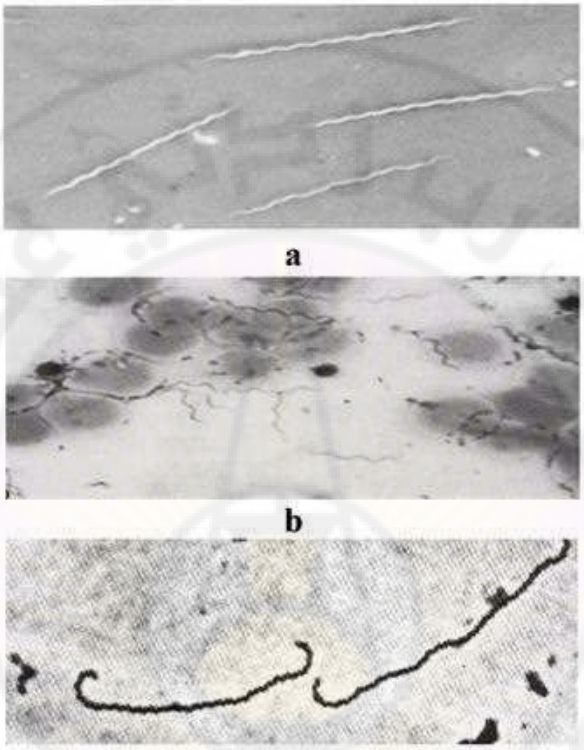
2- اغمر الغشاء بمحلول حمض العفص، وسخّن بلطف فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار، أبعد اللهب قليلاً، ثم كرّر التسخين عدة مرات بالطريقة نفسها مدة نصف دقيقة مع مراعاة عدم غليان الحمض أو جفافه على الشريحة وإضافته كلما احتاج الأمر.

3- اغسل بالماء جيداً.

4- ضع على الغشاء قطرة من محلول نترات الفضة وسخن بلطف مدة نصف

دقيقة، مع مراعاة عدم الغليان والجفاف. ثم اغسل بالماء جيداً.

5- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة.



a

b

c

الشكل 43 صور لبعض الجراثيم اللولبية ملونة بطرائق مختلفة

(a) جراثيم *Treponema pallidum* .

(b) جراثيم *Borrelia duttonii* كما تبدو بدم الإنسان .

***Leptospira interrogans* (c)**

6- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً، ثم بالعدسة الغاطسة.

7- دوّن ملاحظاتك حول التجربة مع الرسم.

- **طريقة ورث – كونكلين أو شيفر – فلتون:**

Wirtz – Conkl.in or Schaeffer- Fulton

تستعمل هذه الطريقة لتلوين الأبواغ عند الجراثيم، حيث تعدّ الأبواغ الداخلية Endospores الطور الساكن لبعض الأنواع مثل المطثيات *Clostridium* والعصيات *Bacillus* . تتصف الأبواغ بأنها أقل قابلية للتلون من الجراثيم بسبب جدارها السميك وكثافة محتوياتها السيتوبلاسمية؛ لذلك تبدو على هيئة بقعة بيضاء لامعة داخل الخلايا الملونة بملونات عادية، فهي تتلون بصعوبة ولكنها تقاوم بشدة عملية إزالة اللون وتأثير الملونات المعاكسة؛ لذلك نلجأ إلى تلوين هذه الأبواغ بطريقة مماثلة لتلوين الجراثيم المقاومة للحموض.

يمكن ملاحظتها دون تلوين باستعمال مجهر الأطوار المتباينة.

الأدوات والمواد اللازمة:

- مزارع جرثومية لأحد الأنواع المتبوغة في مرحلة التبوغ عمرها ثلاثة أيام مثل جراثيم *B. subtilis* أو جراثيم *Clostidium*.
- محاليل الصبغات: صبغة أخضر المالاكيت 5 % Green Malachite ، صبغة السفرانين أو الفوكسين 0.5% (راجع دليل تحضير الصبغات) .
- صفائح زجاجية نظيفة.
- زيت الأرز.

طريقة العمل:

1- حضّر الغشاء الجرثومي، وثبّته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف.

2- اغمر الغشاء بمحلول صبغة المالاكيت، وسخنه على اللهب حتى بدء تصاعد البخار مدة 5 دقائق مع إضافة الصبغة عند اللزوم. تجنب وصول المحضر إلى مرحلة الغليان، أو خذ قليلاً من الماء الغالي في كأس، وضع فوقه قطعة من الشبك المعدني لحمل المحضر الجرثومي، ثم اغمر الغشاء بمحلول صبغة المالاكيت مدة 5 دقائق.

3- اغسل الغشاء بتيار مائي خفيف مدة نصف دقيقة حتى زوال اللون الأخضر.

4- اغمر الغشاء بمحلول السفرانين أو الفوكسين مدة دقيقة واحدة أودقيقة ونصف.

5- اغسل المحضر بالماء جيداً مدة 30 ثانية.

6- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء، أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة.

7- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً، ثم بالعدسة الغاطسة.

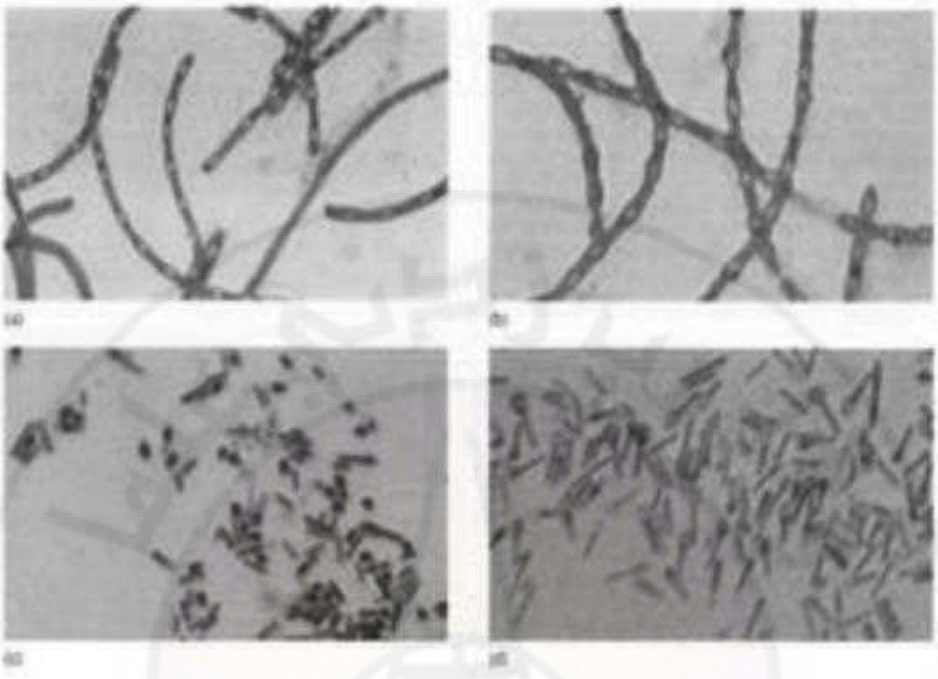
8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة مع الرسم.

يظهر الشكل ٤٤ صوراً لبعض الجراثيم المتبوغة تبدو الأبواغ داخل الخلايا (لاحظ تلون الأبواغ باللون الأخضر المزرق والخلايا باللون الأحمر). وحدّد مكان البوغة داخل الخلية الجرثومية، وحدد حجمها مقارنة بحجم الخلية.

- **طريقة ليفسون Leifson :**

تستخدم هذه الطريقة لتلوين السياط Flagella staining عند الجراثيم المتحركة، وتختلف الجراثيم باختلاف عدد السياط ومواقعها (الشكل ٤٥).

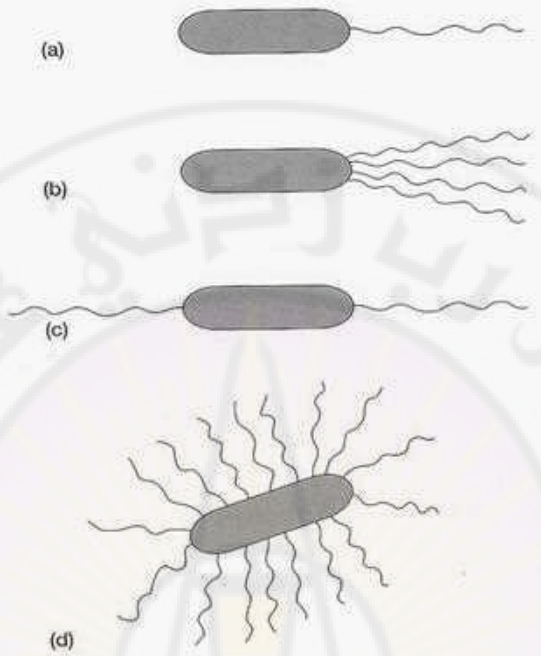
وبما أن السياط ذات قطر صغير (أقل من 0,2 ميكرون) لذلك لابد من تلوينها وفحصها تحت المجهر، وبما أنها سريعة العطب والانفصال وصعبة التلوين؛ لذلك



الشكل 44 صور لبعض الجراثيم المتبوغة تبدو الأبواغ داخل الخلايا

- **(a) جراثيم *Bacillus authracis***
- **(b) جراثيم *Bacillus subtilus***
- **(c) جراثيم *Clostridium botulinu***

تؤخذ الجراثيم من مزروعة فتية عمرها 18- 24 ساعة، وتُستحلب بالماء المقطّر وبلطف ومن دون دعك، ويفضل أن تكون الجراثيم قليلة العدد في المستحلب، ثم نضع قطرة من المستحلب على شريحة نظيفة جداً، ونتركها لتجف، ثم نقوم بعملية التلوين. وهناك عدة طرائق لتلوين السياط تعتمد جميعها على ترسيب الصبغة على السياط لزيادة سماكتها ورؤيتها على نحو أفضل.



الشكل 45 أماكن توضع السياط على الخلية الجرثومية

(a)-وحيد السوط (b)-حزمية السياط

(c)- قطبية السياط (d)-محيطية السياط

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة تقريباً لأنواع *Pseudomonas* أو *Bacillus cereus* .
- صبغة ليفسون لصبغ السياط (راجع دليل تحضير الصبغات).
- صفائح زجاجية نظيفة جداً.

- زيت الأرز.

طريقة العمل:

1- ضع قطرة من معلق جرثومي على صفيحة زجاجية نظيفة مدة دقيقة.

2- امسك الصفيحة على نحو مائل لتنحدر القطرة ببطء إلى الطرف الآخر، ثم اتركها لتجف في الهواء، وهي بشكلها المائل.

3- اغمر الغشاء الناتج بصبغة ليفسون لمدة 10 دقائق.

4- اغسل الغشاء بالماء، وجفّفه بالهواء، ثم ضع عليه قطرة من زيت الأرز، وافحصه تحت العدسة الغاطسة بالمجهر.

5- دوّن ملاحظاتك مع الرسم. (تبدو الجراثيم والسياط ملونة باللون الأحمر).

- **طريقة ولتش Welch method:**

تستعمل هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية Capsule staining . وهي طبقة سميكة لزجة واقية تحيط بالخلية الجرثومية، تختلف ثخانتها من خلية إلى أخرى، وتتكون من مواد سكرية أو ببتيدية معقدة، من أهم وظائفها أنها تحمي الخلية من الظروف غير الملائمة.

هناك عدة طرائق لإظهار المحفظة، ولكن يجب عدم استعمال الماء مهما تكن الطريقة المستعملة في أثناء تحضير الغشاء لأن المحفظة قابلة للذوبان به.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية فتية عمرها 24 ساعة للنوع *Klebsiella pneumonia*.

- محاليل الصبغات: محلول صبغة الفوكسين القاعدية 30% ، محلول كبريتات النحاس $CuSO_4$ 20%، محلول زرقة المِتلين 1% (راجع دليل تحضير الصبغات).
- صفائح زجاجية نظيفة.
- زيت الأرز.

طريقة العمل:

1-حضّر الغشاء الجرثومي، وثبّته بالطريقة المعروفة، وتجنّب غسله بالماء.

2- اغمر الغشاء الجرثومي بمحلول صبغة الفوكسين القاعدية، ومرّرها فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار.

3- اغسل بمحلول كبريتات النحاس.

4- اغمر الغشاء بمحلول زرقة المِتلين، ثم اغسل بالماء.

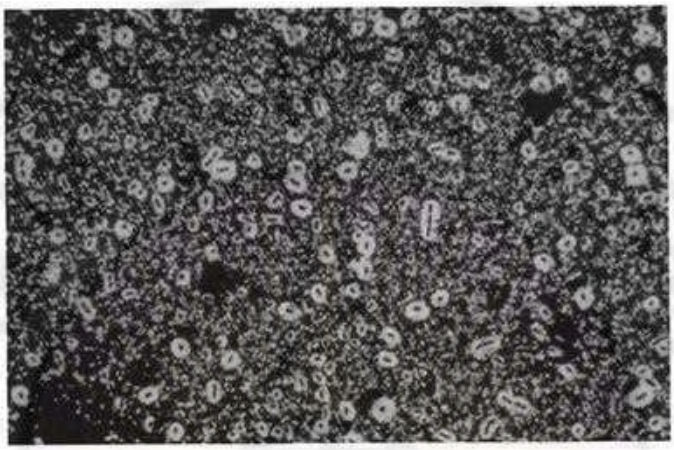
5- جفّف الصفيحة بالهواء، ضَعْ عليها قطرة من زيت الأرز، ثم افحصها تحت المجهر بالعدسة الغاطسة.

6- دوّن ملاحظاتك مع الرسم. (ثم لاحظ تلون المحفظة باللون الأزرق والخلية الجرثومية باللون الأحمر).

- **طريقة الحبر الصيني:**

تستعمل هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية. وهي من أسهل طرائق تلوين المحفظة، ويتم ذلك بمزج قطرة من مستحلب كثيف للجراثيم مع قطرة من الحبر الصيني (الهندي) وفرشها على صفيحة نظيفة وتركها تجف في الهواء (طريقة

التلوين السلبي)؛ فتظهر المحفظة على هيئة هالة لماعة تحيط بالخلية الجرثومية في ساحة مظلمة (الشكل٤٦).



الشكل 46 المحفظة كما تبدو بعد التلوين بالحبر الهندي عند جراثيم *Klebsiella*.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل العاشر

دراسة بعض خواص الجراثيم
وتحديد أنواعها

تُعَدُّ عملية تحديد الأنواع الجرثومية وتمييزها من أهم الأمور في دراسة الأحياء الدقيقة، وهناك مخططات توضح الاختبارات التي ينبغي تطبيقها والأسلوب الذي يجب اتباعه للوصول إلى النتيجة المرجوة. وتهدف هذه الاختبارات إجمالاً إلى التحري عن المعلومات الآتية للوصول إلى الهوية الجرثومية:

- عزل الجراثيم واستزراعها على أوساط مناسبة.
- دراسة مدى حاجة الجراثيم من الأُكسجين.
- تحديد الخصائص الشكلية للجراثيم ومستعمراتها.
- تحديد سلوك الجراثيم تجاه الملونات، ولاسيما تلوين غرام.
- دراسة بعض العوامل المؤثرة في نموها.
- دراسة الخصائص الفيزيولوجية والحيوية الكيميائية.
- تحديد طريقة التغذية.
- دراسة التفاعلات المصلية والمناعية.
- دراسة التراكيب الوراثية للجراثيم (RNA –DNA).

ومن الواضح أن هذه المهمة صعبة وشاقة أحياناً، وتتطلب قدراً كبيراً من الصبر والدقة في العمل واستعمال الخبرة الطويلة والمكتسبة من التجارب الشخصية ومن تجارب أبحاث الآخرين ونتائجهم. ولا يمكن أن يقوم بهذا العمل إلا الباحثون

المتخصصون، لذلك ونظراً إلى ضيق الوقت فإننا نقتصر هنا على إجراء عدد من الاختبارات المهمة في عزل بعض الأنواع واسعة الانتشار وتحديدها.

ولكن يجب الأخذ في الحسبان دائماً أن الاختبار التأكيدي أو الإضافي الذي يكون مفيداً جداً في حالة معينة يمكن أن يكون عديم الفائدة في حالة أخرى، مثال ذلك: اختبار الكاتالاز مهم جداً للتمييز بين المكورات العنقودية إيجابية الكاتالاز، وبين المكورات العقدية سلبية الكاتالاز، ولكنه غير مفيد في التمييز بين أفراد فصيلة الأمعائيات Enterbateriaceae ففي هذه الحالة يمكن أن نلجأ إلى اختبارات أخرى مثل اختبار الإندول أو اختبار أحمر المِتيل – فوكس بروسكاوير.

1- انتشار الأحياء الدقيقة

اختبار سهل نجريه في البداية، لكي نبرهن على وجود الأحياء الدقيقة وانتشارها في كل ما يحيط بنا، وبعد نمو هذه الأنواع المختلفة من الجراثيم، نحاول توصيف المستعمرات النامية للتعرف على أكبر عدد من النماذج المختلفة لأشكال المستعمرات الجرثومية أولاً، ثم إجراء تلوين غرام للتعرف على أشكال الخلايا الجرثومية وطبيعة جدارها الخلوي.

لإجراء هذا الاختبار نعمل على تعريض أحد الأوساط الغذائية المعقمة للهواء أو رذاذ العطاس أو نقوم بمسح سطح الوسط المغذي بإصبع اليد أو بمسحة قطنية معقمة مسح بها سطح الجدار أو المنضدة، أو نقوم بنقل بعض المواد إلى الوسط المغذي كالتربة، أو ماء الصنبور، أو مخلفات الطعام الموجودة على الأسنان أو تحت الأظفار.

ثم نضع الأوساط الملقحة بالحاضنة مدة زمنية محددة بدرجة حرارة مناسبة، حيث يصبح بإمكاننا فحصها بسهولة.

ملاحظة : يمكن أن تنمو على هذه الأوساط أحياء دقيقة مختلفة قد تكون جراثيم أو فطريات، يجب التمييز بينها.

الأدوات والمواد اللازمة:

- وسط غني مثل الآغار المغذي (راجع فقرة تحضير الأوساط الزرعية) معقم موجود في أطباق معقمة، أو في أنابيب على نحو مائل.
- ماسحات قطنية معقمة.
- ماصات معقمة.

طريقة العمل:

1- سجّل على الأطباق المعلومات الآتية: الاسم – الفئة – نوع المعاملة وهي كالآتي:

-طبق معقم شاهد Control.

- هواء.

-أصابع اليد.

-تخفيف من التربة.

-ماء الصنبور.

-رذاذ العطاس.

-بقايا الطعام على الأسنان.

2- اترك طبق معقم دون إضافة أي شيء، فهو شاهد يستعمل للمقارنة ببقية الأطباق.

3- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه هواء، وعرضه لهواء الغرفة، ثم أعد إغلاقه ثانية.

4- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه أصابع اليد، ومرّر على سطحه أحد أصابع اليد، ثم أعد إغلاقه ثانية.

5- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه التربة، وخذ جزءاً من معلق تربة بماصة معقمة، وافرشها على سطح الطبق، ثم أعد إغلاقه ثانية.

6- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه ماء الصنبور، وخذ قليلاً من الماء بماصة معقمة، وافرشها على سطح الطبق، ثم أعد إغلاقه ثانية.

7- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه رذاذ العطاس، واعطس بداخله، ثم أعد إغلاقه ثانية.

8- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه بقايا الطعام على الأسنان، وخذ جزءاً من بقايا الطعام على الأسنان بماسحة قطنية معقمة، وامسحها على سطح الوسط المغذي، ثم أعد إغلاقه ثانية.

9- بلّل الماسحة القطنية المعقمة بالماء المعقم، وامسحها على سطح الجدار بمساحة قدرها 2 سم^2، ثم ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه سطح الجدار وامسحها على سطح الوسط المغذي، ثم أعد إغلاقه ثانية.

10- اقلب جميع الأطباق وضعها في الحاضنة (يفضل وضع كل طبق في كيس من البلاستك) على درجة حرارة 37°م لمدة 24 –48 ساعة.

11- افحص المستعمرات النامية بدقة وقارن بين المستعمرات الجرثومية والمستعمرات الفطرية.

12- ادرس المستعمرات الجرثومية من حيث اللون والشكل والقوام والارتفاع وفق ما ورد في فقرة صفات المزارع ونوع النمو.

13- حضر غشاءً جرثومياً من بعض المستعمرات النامية في الأطباق، ولوّنها بتلوين غرام أو بملون أزرق المِتلين أو بملون إيوزينات الصوديوم، وافحصها تحت المجهر.

14- دوّن ملاحظاتك السابقة جميعها، وارسم الأشكال الجرثومية المختلفة للمستعمرات والخلايا.

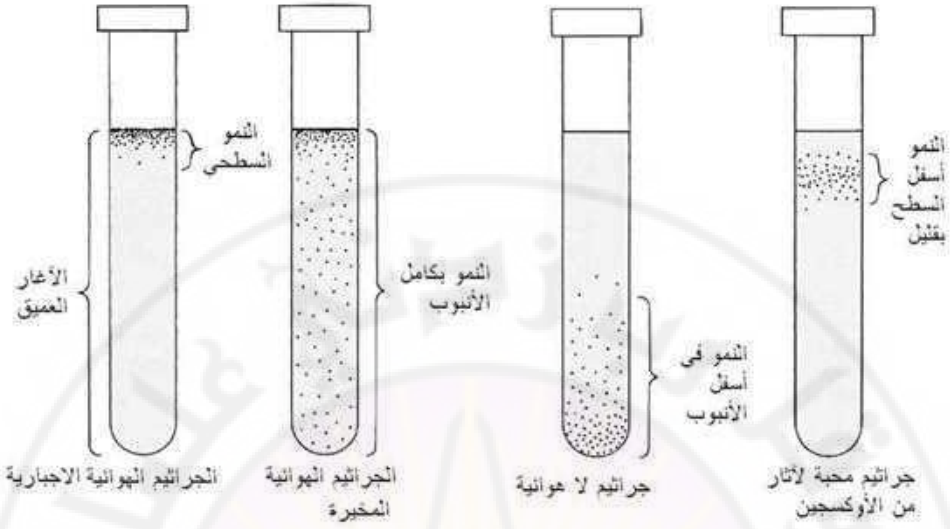
2- تحديد حاجة الجراثيم لأُكسجين الهواء

استزراع الجراثيم الهوائية واللاهوائية:

يعد الأُكسجين من أهم الغازات التي تؤثر في حياة الجراثيم ونموها، وتقسم الجراثيم تبعاً لحاجتها من الأُكسجين إلى أربعة أنواع (الشكل ٤٧):

1- الجراثيم الهوائية Aerobic bacteria تنمو بوجود الأُكسجين، وهي جراثيم تحتوي على إنزيمات الأكسدة، من أمثلتها: *Azotobacter , Bacillus subtilis* .

2- الجراثيم اللاهوائية Anaerobic bacteria تنمو بغياب الأُكسجين حيث لا تملك الكتالاز Catalase التي تفكّك الماء الأكسجيني المتكوّن في الخلايا إلى ماء وأُكسجين، لذلك يعدُّ الأُكسجين سمّاً لها، وهي جراثيم تحصل على الطاقة اللازمة لها من عملية التخمر (عكس الهوائية)، من أمثلتها *Clostridium* .



الشكل47 حاجة الجراثيم للأُكسجين

3- الجراثيم اللاهوائية اختيارياً Facultatively anaerobic bacteria تنمو بوجود الأُكسجين أو بغيابه، وهي قادرة على القيام بعمليات التخمر والتنفس معاً حسب وفرة الأُكسجين. من أمثلتها: أنواع *Escherichi* .

4- الجراثيم أليفة قلة الأُكسجين Microaerophitic bacteria تنمو بوجود كميات قليلة جداً من الأُكسجين وتفضل نسبة محددة من غاز ثنائي أُكسيد الكربون CO_2 (5- 10%)، وتكون حساسة تجاه وفرة الأُكسجين لاحتوائها بعض إنزيمات الأكسدة فقط. من أمثلتها: *Lactobacillus*.

- ويكفي لتنمية الجراثيم الهوائية أن تترك أنابيب الاختبار المزروعة تحت الظروف العادية لتأمين احتياجاتها من أُكسجين الهواء، أما إذا أُريد الحصول على نمو أفضل، فتزاد درجة تعريض هذه المزارع إلى الأُكسجين الجوي، إما عن

طريق تكبير سطح المزرعة المعرض للهواء أوعن طريق التهوية الصنعية لهذه المزارع.

– أما تنمية الجراثيم اللاهوائية، فيحتاج إلى طرائق ومعدات خاصة للتخلص من الأكسجين المنحل في الوسط الزرعي أو الموجود في الجو المحيط بالمزارع (راجع فقرة استزراع الجراثيم اللاهوائية المجبرة).

الأدوات والمواد اللازمة :

– عدد من أنابيب آغار غلوكوز (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) بالشكل العميق.

– إبر تلقيح جرثومية مستقيمة للوخز.

– مزارع جرثومية لأنواع مثل: *E.coli - Bacillus subtilis - Clostridium sporogenes – Lactobacillus lactca*

– معلق تربة.

– حمام مائي.

طريقة العمل:

1– اغمس إبرة التلقيح المستقيمة بعد تعقيمها وتبريدها في المعلق المائي للتربة أو في أحد المزارع الجرثومية السابقة.

2– لقّح الأنابيب السابقة بأحد هذه الجراثيم كلاً على الترتيب بطريقة الوخز، سجّل اسمك والنوع الجرثومي على جميع الأدوات المستعملة.

3– اصهر أنابيب أخرى تحتوي الوسط في حمام مائي، وبرّده حتى الدرجة 45°م، ثم لقّح كل أنبوب بأحد الجراثيم السابقة أو بمعلق التربة بطريقة المزرعة المهتزة

(متساوية التوزيع) ثم حرّك الأنابيب بين راحتي اليد لتتوزع الجراثيم جيداً، واترك الأنابيب لتجمد بالوضع القائم.

4- احضن الأنابيب بدرجة حرارة 37°م مدة 2-3 أيام.

5- افحص الأنابيب ولاحظ النمو في كل من الطريقتين.

6- سجّل ملاحظاتك مع الرسم.

3- تأثير درجة الحرارة في نمو الجراثيم

تؤثر درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم، فهي تحدّد سرعة نموها ومقدار نموها الكلي ولها تأثير في العمليات الاستقلابية وفي شكل الخلايا. يتميز كل نوع جرثومي بدرجة حرارة دنيا ومثلى وعظمى. وتبعاً لذلك تقسم الجراثيم إلى:

1- جراثيم أليفة البرودة Psychrophiles تتميز بقدرتها على النمو في درجة حرارة الصفر المئوية أو أقل من ذلك أو أكثر بقليل، لكن الدرجة المثالية لنموها هي بين 15-20°م.

2- جراثيم أليفة الحرارة المعتدلة Mesophiles يكون نموها الأفضل بين درجة الحرارة 25-40°م.

3- جراثيم أليفة الحرارة المرتفعة Thermophiles يكون النمو الأفضل لهذه الجراثيم بين 45 – 60°م، وتقسم هذه الجراثيم إلى قسمين:

- جراثيم أليفة الحرارة المرتفعة اختيارياً Facultative thermophiles
- جراثيم أليفة الحرارة المرتفعة إجبارياً Obligate thermophiles وهي التي لا يمكن أن تعيش إلا في الحرارة العالية (نحو 60°م)، مثال جراثيم الينابيع الكبريتية الحارة.

وفي الحقيقة ليس هناك حدود معينة وثابتة لدرجة الحرارة المثلى؛ لذلك يفضل عند زرع أي نوع جرثومي معرفة درجة الحرارة المناسبة لهذا النوع بالذات.

أ – تقدير درجة الحرارة المثلى لنمو الجراثيم:

تعرف درجة الحرارة المثالية بأنها الدرجة التي تسمح بالنمو السريع لمستعمرة جرثومية خلال مدة زمنية قصيرة تتراوح بين 12 – 24 ساعة. ويمكن تحديدها باختبار سهل، مبدؤه حضن المستعمرة الجرثومية المراد تحديد درجة حرارتها المثلى بدرجات حرارة مختلفة، ثم تقدير أي من هذه الدرجات أفضل للنمو.

الأدوات والمواد اللازمة:

- مزارع جرثومية، لكل مثل: *B. subtilis – E. coli – Serratia marcescens* وغيرها.
- أنابيب آغار مغذ مائل معقمة (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).
- إبر تلقيح جرثومية.
- حاضنات على درجات حرارة مختلفة: 25°م ، 37°م ، 60°م.
- ثلاجة بدرجة حرارة 5°م.

طريقة العمل:

1- لقح أربعة أنابيب آغار مائل من كل مزرعة جرثومية. سجّل على جميع الأنابيب اسمك واسم النوع الجرثومي وتاريخ التلقيح.

2- احضن من كل نوع أنبوبة على درجات الحرارة السابقة: 5°م في الثلاجة، 25°م في الحاضنة، أو يمكن الاستعاضة عنها بدرجة حرارة الغرفة، 37°م في الحاضنة، 55°م في الحاضنة.

3- افحص الأنابيب بعد 24 ساعة، ثم يومياً مدة أسبوع بالعين المجردة، ولاحظ معدل النمو وإنتاج الصباغ لبعض الجراثيم.

4- سجّل النتيجة في جدول (جدول ٧):

جدول رقم /7/ نتائج النمو الجرثومي وفقاً لدرجة الحرارة

النوع الجرثومي	معدل النمو على درجة الحرارة			
	5° م	25° م	37° م	55° م
E . Coli				
B . subtilis				
Clostridium				

5-عبّر عن النتيجة كالآتي: - لا يوجد نمو ، + نمو قليل أو ضعيف، ++ نمو جيد ، +++ نمو ممتاز.

ب- تقدير معدل موت الخلايا الجرثومية نتيجة ارتفاع درجة الحرارة:

تتفاوت الجراثيم في درجة تحملها للحرارة المرتفعة، وتتوقف مقاومة هذه الجراثيم على درجة الحرارة المستعملة ومدة التعرض لهذه الحرارة.

الأدوات والمواد اللازمة:

- معلقات جرثومية لجراثيم مختلفة مثل: *E. coli* – *B. subtilis* – *Staph.aureus* .
- إبرة زرع جرثومية ذات العقدة.
- ماصات معقمة.
- حمّام مائي.

- ميزان حرارة.
- أنابيب آغار مغذٍ مائل معقمة، أو أطباق تحتوي على الآغار المغذي المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

طريقة العمل:

1- حضّر المعلق الجرثومي المطلوب في أنبوبة تحتوي الماء المقطر(أو الماء الفيزيولوجي) المعقم، ثم خذ منه بإبرة الزرع ملء عقدة، ازرعها على أنبوب آغار مائل بطريقة التخطيط، أو خذ بماصة معقمة 1 مل، وضعها في طبق بتري معقم. وهذا الشاهد. سجّل اسمك والنوع الجرثومي وتاريخ الزرع على كل الأدوات المستعملة.

2- جهّز حمّاماً مائياً وارفع درجة حرارته إلى 45°م، ضع فيه الأنبوبة الحاوية على المعلق الجرثومي مدة 10 دقائق، ثم خذ منه بإبرة الزرع ملء عقدة، ازرعها على أنبوب آغار مائل بطريقة التخطيط، أو خذ بماصة معقمة 1 مل، وافرشها على سطح طبق بتري معقم.

3- ارفع درجة حرارة الحمام المائي إلى 50°م، ضع فيه الأنبوبة الحاوية المعلق الجرثومي مدة 10 دقائق، ثم خذ منه بإبرة الزرع ملء عقدة، ازرعها على أنبوب آغار مائل بطريقة التخطيط، أو خذ بماصة معقمة 1 مل وافرشها على سطح طبق معقم، كالسابق.

4- كرّر العملية السابقة عند درجة الحرارة 55°م و 60°م و 65°م و70°م.

5- ضع الأنابيب والأطباق (بالوضع المقلوب) في الحاضنة على درجة حرارة 37°م مدة 48 ساعة، ثم مدة أسبوع.

6- ادرس النمو في الأنابيب والأطباق، وقدّر عدد المستعمرات النامية في كل منها.

7- سجّل النتائج في جدول (جدول ٨):

جدول رقم /8/ نتائج تقدير معدل موت الخلايا الجرثومية نتيجة ارتفاع درجة الحرارة

نوع الجرثوم	عدد المستعمرات النامية						
	الشاهد	45° م	50° م	55° م	60° م	65° م	70° م
E.Coli							
B.subtilis							
Staphilococcus							

8- ارسم مخططاً بيانياً يوضح النسبة المئوية لعدد الخلايا الحية مع درجة الحرارة.

9- لاحظ أن موت الخلايا الجرثومية يتناسب طرداً مع درجة الحرارة، فكلما ارتفعت درجة الحرارة ازداد عدد الخلايا الميتة، وكذلك كلما ازداد زمن التعرض للحرارة ازداد عدد الخلايا الميتة.

4- تأثير pH في نمو الجراثيم

يؤثر الرقم الهيدروجيني في نمو الجراثيم، ويتميز كل نوع جرثومي بدرجة pH مثالية يبلغ فيها نشاطه الفيزيولوجي حداً أعظمياً. وكثيراً ما تضاف إلى الأوساط الزرعية المختلفة مواد واقية (منظمة) Buffer solutions مثل أملاح الفُسفات والكربونات وأحياناً البروتينات لتحافظ قدر الإمكان على قيمة ثابتة لرقم pH؛ لأن نمو الجراثيم في الوسط يؤدي إلى تغير في قيمة pH ، وعموماً يفضل معظم

الجراثيم قيم pH المعتدلة بين 6.5 – 7.5، لكن بعض الجراثيم كضمات *Vibrio comma* تفضل وسطاً قلوياً pH 8، والعصيات اللبنية *Lactobacillus* تفضل وسطاً حمضياً pH 4 ، لذلك نسميها جراثيم أليفة للحموضة. ويمكن القول أن قيمة pH الدنيا والقصوى للجراثيم تتراوح بين 4 – 9.

أخيراً، إن وجود شوارد الهيدروجين وشوارد الهيدروكسيل في الوسط المغذي يجعل الوسط ساماً للجراثيم، وتعد الأوساط الحمضية أقل سمية من الأوساط القلوية.

الأدوات والمواد اللازمة

- مزارع جرثومية مختلفة.
- إبر تلقيح جرثومية.
- أنابيب اختبار معقمة تحتوي المرق المغذي (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المحضر بدرجات حموضة مختلفة (3– 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9) حيث يحمض الوسط بإضافة حمض اللبن أو الطرطريك أو الليمون، أما جعل الوسط قلوياً فيكون بإضافة كربونات الصوديوم.

طريقة العمل:

1– لقّح أنابيب المرق المغذي متباينة الحموضة بالنوع الجرثومي المراد دراسته. سجّل اسمك والنوع الجرثومي وتاريخ الزرع على جميع الأدوات المستعملة.

2– ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة مدة يومين، ثم مدة أسبوع.

3– اقرأ النتيجة حسب ظهور العكر في الوسط، حيث يتناسب عدد الخلايا النامية طرداً مع درجة العكر. أفضل قيمة pH هي عند أعلى درجة عكارة في الأنابيب السابقة.

4- سجّل ملاحظاتك في جدول مناسب معتمداً الرموز نفسها التي استعملناها عند دراسة تأثير درجة الحرارة في النمو.

5- ارسم مخططاً بيانياً يوضح نسبة عدد الخلايا الميتة مع تغير درجات الحموضة.

5- تأثير المواد المضادة للجراثيم

إن المطهرات والصادات الحيوية تؤثر في النمو الجرثومي، وتستعمل عادة للقضاء على الجراثيم، ويختلف هذا التأثير باختلاف النوع الجرثومي من ناحية واختلاف المادة المستعملة من ناحية أخرى، وقد يكون هذا التأثير مثبطاً للنمو Bacteriostatic مثل بعض الأصبغة أو قاتلاً Bactericidal مثل الهالوجينات ومشتقاتها، إن التمييز بين الحالتين ليس سهلاً بسبب تداخلها أحياناً. والمهم أن بعضاً من هذه المواد له تأثير نوعي في بعض الجراثيم، ويمكن الاستفادة من هذه الخاصة بإضافتها للأوساط الجرثومية لعزل بعض الجراثيم التي لا تتأثر بها، وهذا هو مبدأ الأوساط الاصطفائية، مثال الوسط المضاف إليه البنسلين لعزل الأنواع المقاومة مثل المستدميات، والوسط المضاف إليه البلورات البنفسجية لعزل الجراثيم سلبية الغرام. وهذا ما يحتم علينا دراستها بغية التحكم بها وإيقاف نمو الجراثيم الضارة منها وخصوصاً إذا كانت ممرضة.

أ-تأثير الصادات الحيوية:

يمكن إجراء مثل هذا الاختبار وفق الآتي:

الأدوات والمواد اللازمة:

- أطباق فارغة ومعقمة.
- وسط الآغار المغذي (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المعقم والمصهور بدرجة حرارة 45°م.

- أقراص من صادات حيوية مختلفة (أقراص التحسس) أو أقراص لمزارع فطرية مختلفة عمرها من أسبوع إلى عشرة أيام.
- ملقط معقم لالتقاط الأقراص- مسبر خاص لأخذ أقراص المزارع الفطرية.
- إبر زرع جرثومية.
- مزارع جرثومية أو معلقات جرثومية لأنواع مختلفة عمرها 24 – 48 ساعة.

طريقة العمل:

1- وزع الآغار المصهور على الأطباق (نحو 20 مل في كل طبق) واتركها تبرد وتتصلب.

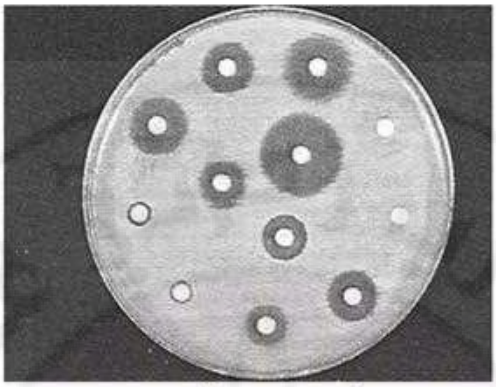
2- اكتب على الأطباق الاسم والفئة والنوع الجرثومي المراد استعماله، واسم الصاد الحيوي أو الفطر المراد استعماله في هذا الطبق.

3- ضع 1 مل من المعلق الجرثومي المراد دراسته على سطح الآغار المغذي في كل طبق، ثم انشره على السطح بانتظام.

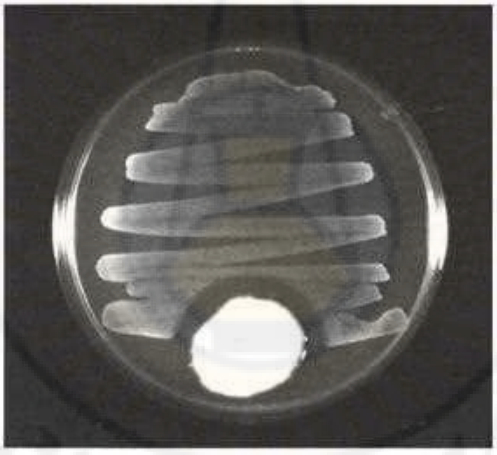
4- يمكنك إجراء المراحل السابقة بطريقة أخرى هي: صبْ جزءاً من المعلق الجرثومي على الوسط المغذي المصهور بدرجة الحرارة 45°م، ووزعه جيداً بداخله، وقبل أن يتصلب الوسط وزعه على الأطباق، واتركه ليتصلب، تكون بذلك حصلت على وسط مُغذٍ متساوي التوزيع للجراثيم.

5- خذ بالملقط المعقم (بعد تمريره على اللهب وتبريده) قرصاً من أقراص الصادات الحيوية المتنوعة (الشكل ٤٨)، أو خذ بالمسبر الخاص قرصاً دائرياً من مزرعة الفطر (الشكل ٤٩)، وضعه على سطح الآغار السابق، كثيراً ما نضع 2 – 4 أقراص في كل طبق، أو أكثر حسب قطر الطبق.

6- احضن الأطباق مقلوبة في الحاضنة بشروط مناسبة لنمو الجراثيم بالدرجة 37°م مدة 24 ساعة.



الشكل 48 منطقة التثبيط حول أقراص الصادات الحيوية



الشكل 49 يوضح عمل فطر البنسيليوم كمثبط جرثومي . حيث تفرز مستعمرة البنسيليوم *Penicilium* الصاد الحيوي االبنسلين الذي يقتل خلايا *Staphylococcus aureus* الموجودة قربه على نحو مخطط .

7- لاحظ نمو الجراثيم في كامل الطبق، وفتش عن وجود هالة شفافة خالية من النمو الجرثومي حول أقراص الصادات الحيوية (منطقة التثبيط) Zone of

inhibition ، أو حول أقراص الفطر، إن وجود مثل هذه الهالات الشفافة من عدم النمو يعني أن الجراثيم قد تأثرت بهذا الصاد الحيوي أو الفطر، أو بمعنى آخر إن الصاد الحيوي أو الفطر قد ثبط نمو الجراثيم.

8- سجّل ملاحظاتك مع الرسم.

ب- تأثير المواد الكيميائية السامة:

اتبع خطوات الاختبار السابق نفسها ولكن بدلاً من أن تستعمل أقراص الصادات الحيوية، استعمل أقراصاً من ورق الترشيح مشربة بإحدى المواد الكيميائية السامة بتراكيز مناسبة مثل: البلورات البنفسجية أو الماء الأُكسجيني أو اليود أو الكحول (راجع فقرة المطهرات).

- يمكنك عمل حفرة في الوسط المغذي وصَبُّ كميةٍ من المادة الكيميائية المراد اختبارها في هذه الحفرة (بدلاً من وضع القرص المشرب بالمادة) ثم تُحضن، ولكن بالوضع الصحيح غير المقلوب كي لا تنسكب المادة الكيميائية المستعملة.

- يمكنك **دراسة تأثير الكحول** في الجراثيم بإجراء الاختبار السهلِ الآتي:

الأدوات والمواد اللازمة :

- أنابيب اختبار فارغة معقمة.
- مزارع جرثومية مختلفة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- كحول إيتيلي بتراكيز مختلفة 60% - 70% - 80% - 95% - كحول مطلق.

-أطباق تحتوي على وسط الآغار المغذي المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

طريقة العمل:

1- ضع في الأنابيب الفارغة المعقمة كميات متساوية من التراكيز المختلفة للكحولات السابقة.

2- انقل إلى كل أنبوب كميات متساوية قدر الإمكان من المزرعة الجرثومية المراد دراستها (إذا تعذر ذلك يمكنك إجراء معلق جرثومي، ثم نقل كميات متساوية منه إلى الأنابيب السابقة).

3- اترك الجراثيم على تماس مباشر مع الكحول مدة دقيقتين.

4- اكتب على الأطباق الموجودة أمامك ما يأتي: اسمك- الفئة- النوع الجرثومي - تركيز الكحول.

5- انقل كميات متساوية من المعلق الجرثومي في الكحولات المختلفة إلى أطباق الوسط المغذي، وافرشها جيداً على سطحه.

6- احضن بدرجة حرارة 37°م مدة 24 - 48 ساعة.

7- اقرأ النتائج بعدّ المستعمرات الجرثومية النامية في الأطباق لكل تركيز من الكحول.

8- سجّل النتائج، وقارنها، واستنتج أفضل تركيز للكحول تأثرت به الجراثيم.

6- دراسة الخصائص الحيوية الكيميائية للجراثيم

نعرض هنا عدداً من هذه الاختبارات الأكثر استعمالاً في تحديد هوية الجراثيم،

وسنكتفي بطريقة إجراء هذه الاختبارات وتحديد النتيجة دون التعرض لتشخيص الهوية.

آ- اختبارات استقلاب السكريات بوساطة الجراثيم

١- اختبار تخمر السكريات:

يُعدُّ هذا الاختبار مهماً في تعريف الأنواع الجرثومية المختلفة، إذ لا تقتصر نتائجه على التمييز بين جراثيم تخمر السكريات وأخرى لا تخمرها، وإنما نستطيع بوساطته التمييز بين الأنواع التي تخمر نوعاً أو أكثر من السكريات منتجة حمضاً أو غازاً، وبين الأنواع التي تخمر السكريات نفسها منتجة حمضاً فقط دون الغاز، ويكون الغاز المنتج عادة هو CO_2 و H_2.

ولإجراء الاختبار نكتفي بزرع الجراثيم على وسط سائل وهو الماء الهضموني المضاف إليه أحد أنواع السكريات بنسبة 0.5 – 1% أو أكثر بحيث لا يتجاوز تركيز السكر النهائي 5%، مع إضافة مشعر لوني (مثل زرقة البروموتيمول Blue Bromothymol أو حمرة الفينول) لملاحظة تغير pH في الوسط، فإذا حدث التخمر انخفضت قيمة pH بسبب إنتاج الحمض وتغير لون المشعر الموجود، كما أن استعمال أنابيب درهام Durham (أنبوب صغير يوضع بداخل أنبوب الاختبار) على نحو منكس أمر ضروري لاختبار انطلاق الغاز، فإذا انطلق الغاز فإنه سيتجمع على هيئة فقاعة كبيرة أو صغيرة ظاهرة للعين المجردة في أنبوب درهام، ويمكن أحياناً أن يندفع الأنبوب الصغير نحو الأعلى بسبب وجود كمية كبيرة من الغاز. أما إذا كانت الجراثيم تخمر السكريات دون إطلاق غاز فإننا لا نلاحظ أي فقاعات أو تغير في وضع الأنبوب الصغير.

الأدوات والمواد اللازمة:

- أنابيب اختبار تحتوي على وسط الماء الهضموني (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المُضاف إليه السكر المراد دراسته (الغلوكوز أو اللاكتوز أو السكروز أو المالتوز أو الدكسترين) والمشعر، مع وضع أنبوب دورهام بداخله.
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 – 48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

طريقة العمل:

1- اكتب على الأنابيب (اسمك– الفئة – النوع الجرثومي– اسم السكر الموجود).

2- لقح أنابيب الاختبار السابقة بمعدل أنبوبة واحدة من كل نوع من السكريات بنوع واحد من الجراثيم المدروسة، واترك أنبوبة واحدة شاهداً سلبياً.

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 24 – 48 ساعة.

4- اقرأ النتائج بملاحظة تكوين الحمض بتغير لون المشعر (من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر في حال استعمال مشعر أزرق البروم تيمول – ومن اللون الأحمر إلى اللون الأصفر في حال استعمال مشعر حمرة الفينول). أما بقاء اللون على حاله فيعني عدم تكوين الحمض، ثم عدم تخمر السكر (الشكل ٥٠).

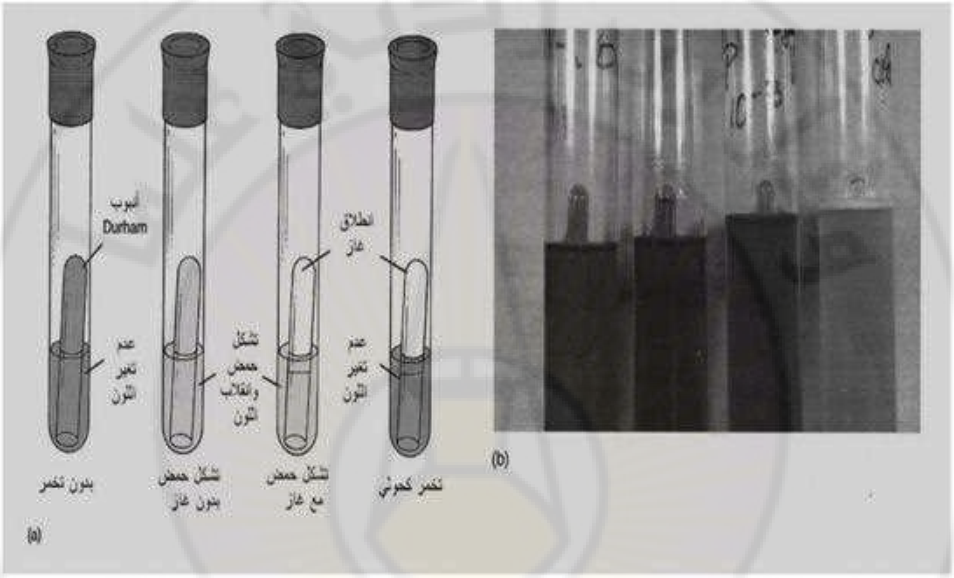
5- لاحظ إنتاج غاز أو عدم إنتاجه من وجود الفقاعات في أنبوبة درهام.

6- سجّل النتائج في جدول (الجدول 9) ضع إشارة + للاختبار الإيجابي وإشارة – للاختبار السلبي.

ملاحظة:

في حال عدم تأمين أنابيب درهام يمكن صب طبقة من الفاسبار Vaspar (مزيج متساوي الحجم من الفازلين والبَرَفين المصهورين معاً) بسماكة 2/1 – 1 سم

فوق سطح أنابيب الاختبار بعد تلقيحها بالجراثيم، وتركها حتى تتصلب ثم نحضنها، ونراقب انطلاق الغاز عن طريق انزلاق طبقة الفاسبار إلى الأعلى وتجمع الغاز أسفلها.



الشكل 50 تخمر السكريات

الجدول 9 نتائج اختبار تخمر السكريات

النوع الجرثومي	غلوكوز		لاكتوز		سكاروز		مالتوز		دكسترين	
	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز
E.Coli										
B.subtilis										
Staphylococcus										

٢– اختبار تحلل النشاء (اختبار الأميلاز **Amylase**):

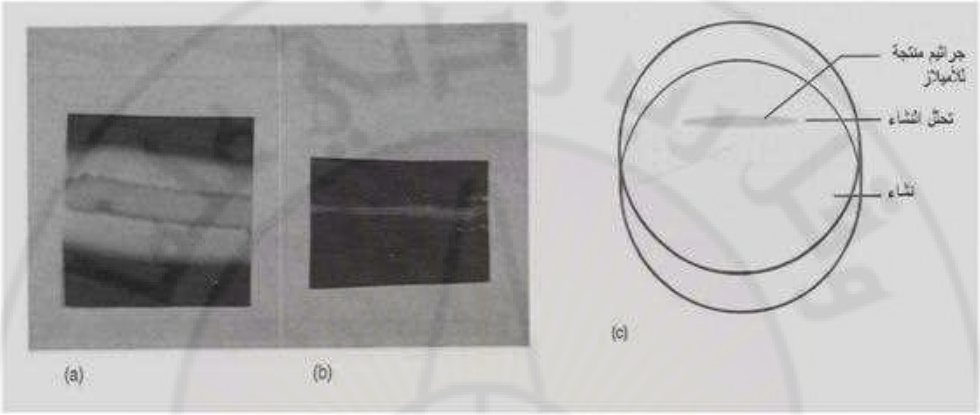
يعد جزيء النشاء كبيراً جداً ولا يمكن أن يعبر إلى داخل الخلية الجرثومية؛ لذلك يفرز بعض الجراثيم إنزيمات خارجية Exoenzymes تقوم بتحطيم النشاء إلى
وحدات صغيرة يمكن أن تستعمل من قبل الخلية الجرثومية، ومن هذه الإنزيمات Oligo–1.6–glocosidase و α.amylase، تتألف جزيئة النشاء من مركبين: الأميلوز Amylose وهو سكر غلوكوز متعدد الجزيئة (200 -300 وحدة) غير متفرع والأميلوبكتين Amylopectin وهو سكر متعدد الجزيئة ضخم ومتفرع.

وعند حلمهة هذين المركبين بفعل الإنزيمات المنتجة من قبل الجراثيم تتحول إلى الدكسترين والمالتوز والغلوكوز القابلين للامتصاص من قبل الخلايا الجرثومية، وفق التفاعل الآتي:

Starch
[Amylose + Amylopectin] $\xrightarrow[H_2O]{\alpha\text{-amylase}}$
(Large polysaccharide)

Dextrins (Intermediate polysaccharides) + Maltose (Disaccharide) + Glucose (Monosaccharide)

ويمكن استعمال صبغة الغرام اليودية (محلول لوغول) ليتم الاستدلال على وجود النشاء، فعند ملامسة اليود للنشاء يتشكل معقد بني إلى أزرق، أما إذا كان النشاء قد تحلل فلا يظهر ذلك اللون (الشكل ٥١).



الشكل 51

(a) ظهور هالة شفافة بعد إضافة محلول لوغول دليل تحلل النشاء – (b) عدم ظهور الهالة دليل عدم تحلل النشاء – (c) رسم يوضح اختبار تحلل النشاء.

ملاحظة:

قد يتدرج لون معقد نشاء – يود تبعاً لتركيز اليود المضاف وكميته.

ملاحظة:

إذا كانت النتيجة صعبة القراءة بسبب ظهور لون بُنّي محمّر سببه جزيئات اليود غير المتفاعلة، يمكن استعمال وسيلة بديلة، هي: نقلب الطبق الحاوي الجراثيم المراد اختبارها– بعد رفع الغطاء عنها– على حامل أو طبق كبير يحتوي بلّورات

اليود والأبخرة المتصاعدة ستتفاعل مع النشاء من دون إعاقة القراءة بسبب ظهور اللون البنّي المحمّر الناجم عن جزيئات اليود غير المتفاعلة.

ملاحظة:

في حال أعطت الجراثيم لوناً بنفسجياً محمراً بإضافة اليود (حل جزئي للنشاء) يجب إعادة الاختبار بعد فترة حضن إضافية.

المواد والأدوات اللازمة:

- أطباق حاوية وسط آغار النشاء Starch agar المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 –48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- صبغة غرام اليودية (محلول لوغول).

طريقة العمل:

1- اكتب على الأطباق (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي) .

2- لقّح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك على هيئة خطوط متباعدة.

3- ضَعْ الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 1- 5 أيام، وبعد مدة الحضن المناسبة اكشف عن النشاء بوضع الكاشف على طول خط التلقيح على وسط آغار النشاء، فإذا بقيت المنطقة المحيطة بخط التلقيح نيّرة، ولم يتغير لونها فإن النشاء قد تحلل، أما إذا ظهر لون مخالف فارجع للملاحظات السابقة.

تحذير مهم:

ضَعْ قطرات اليود على جزء صغير من بداية خط النمو الجرثومي، من أجل عدم تلوث الطبق وتغيير لونه بالكامل، ففي حال احتجنا إلى إعادة حضن الطبق ليوم آخر نستطيع ذلك.

- من الجراثيم المحلّلة للنشاء *Bacillus subtilis*.
- من الجراثيم غير المحلّلة للنشاء *E. coli*.

ب- اختبارات تحلل البروتين:

يستطيع كثير من الجراثيم أن يفكّك البروتينات، وينتج عن ذلك عادة مجموع من النواتج النهائية (الماء – النشادر – الإندول) ويمكن أن نستعمل لإنتاج حموض أمينية بنائية أخرى.

تعد طريقة استعمال الأحياء الدقيقة للحموض الأمينية والبروتينات مميزة للأجناس والأنواع وهي تستعمل لتحديدها.

١ – إماهة الهلام Gelatin

يستعمل هذا الاختبار للكشف عن الجراثيم المحللة للبروتينات، ونحصل على الهلام بدءاً من البروتينات الحيوانية حيث يغزر وجوده في النسج الواصلة، ويكون الهلام مائعاً (مصهوراً) عند درجة الحرارة 25°م وما فوق، وصلباً عند درجات الحرارة الأخفض من ذلك.

إن الجراثيم المنتجة للجيلاتيناز Gelatinase أو Protease تستطيع أن تميع الهلام حتى في درجات الحرارة المنخفضة، ولا تستطيع الأنواع الجرثومية

الأخرى تحليله فيبقى صلباً في درجات الحرارة الأدنى من 25°م، وبذلك يمكن تحديد الأنواع الجرثومية.

المواد والأدوات اللازمة:

- أنابيب اختبار أو أطباق حاوية وسط الهلام المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 –48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة أو مستقيمة.

طريقة العمل:

1- اكتب على الأطباق والأنابيب (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي).

2- لقّح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة التخطيط. اترك طبقاً كشاهد من دون تلقيح.

3- لقّح الأنابيب السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة الوخز. اترك أنبوباً كشاهد من دون تلقيح.

4- ضع الأطباق والأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 1 إلى 7 أيام.

5- بعد مدة الحضن المناسبة اكشف عن إماهة الهلام، بوضع الأنابيب في الثلاجة مدة نصف ساعة أو بوضعها في إناء مملوء بقطع من الثلج، فإذا تجمد الهلام كانت النتيجة سلبية، أما إذا بقي سائلاً فإن الجراثيم تحتوي الإنزيم المحلل للهلام (الشكل ٥٢).

ملاحظة: إذا أردت أن تدرس وجود النمو من عدمه، وشكل الإسالة، فاحضن الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة أو بالحاضنة على درجة الحرارة 24°م مدة أسبوعين.

6- للكشف عن إماهة الهلام في الأطباق، اغمر سطح الهلام في هذه الأطباق بعد مدة الحضن بمحلول كبريتات الأمونيوم 3-5%، واتركه نحو خمس دقائق ثم تخلص من المحلول. إن ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات الجرثومية يعد دليلاً على تحلل الهلام، بينما يدلُّ وجود الراسب الأبيض حول المستعمرات على عدم تحلله.

7- سجّل النتائج في جدول (الجدول ١٠)

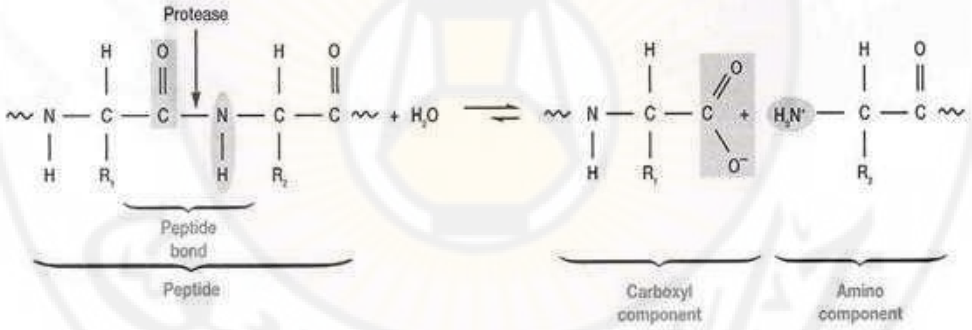
الشكل 52 اختبار إماهة الهلام: الأنبوب بالأسفل إيجابي الإماهة، أما الأنبوب بالأعلى فسلبي الإماهة

الجدول 10 نتائج إماهة الهلام

نوع الجرثوم	الجيلاتين في الأنابيب		الجيلاتين في الأطباق
	وجود النمو	شكل الإسالة	
E . Coli			
B . subtilis			
St . faecalis			

٢- إماهة الكازئين

يعدُّ الكازئين المادة البرتينية الأساسية في الحليب، يوجد على هيئة معلق غروي يُعطي الحليب لونه المعروف، تقوم كثير من الجراثيم بإماهة الكازئين لتنتج مشتقات أكثر قابلية للانحلال، وفق التفاعل الآتي:



الكازئين هو فُسفوبروتين تفككه الجراثيم التي تصنع إنزيماً خارجياً هو Caseas، وتستعمل هذه الخاصة في تحضير الأجبان، ويمكن الاستفادة منها في تحديد الجراثيم.

المواد والأدوات اللازمة:

- أطباق فارغة ومعقمة.
- وسط الآغار المغذي المعقم (راجع صفحة تحضير الأوساط الزرعية) والموجود في زجاجة.
- حليب طازج منزوع القشدة معقم أو حليب مجفف معقم منزوع الدسم.
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 – 48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

طريقة العمل :

1- اكتب على الأطباق (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي).

2- اصهر الآغار المغذي، وبرّده إلى درجة الحرارة 45°م – 50°م، ثم أضف الحليب المعقم، بشروط عقيمة بنسبة 1 مل حليب لكل 10 مل آغار مغذي، أو بنسبة لا تزيد على 5% من الحليب الجاف.

3- لقّح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة التخطيط أو على هيئة بقع ويفضل وخز الطبق (الشكل٥٣).

4- ضَعْ الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 3 –7 أيام.

5- بعد مدة الحضن المناسبة اكشف عن إماهة الكازئين بالتحري عن وجود هالة شفافة خالية من الحليب حول المستعمرة النامية وتحتها، وهي دليل على إماهة الحليب، ويمكن ملاحظة ذلك بسهولة عند وضع الطبق فوق سطح أسود اللون.

الشكل53 هالات شفافة حول الجراثيم المحللة للكازئين

(a) لقح الطبق بالجراثيم المراد اختبارها

(b) ظهور هالات شفافة تعني حلمهة الكازئين

٣ – اختبار إنتاج الإندول

الإندول مركب آزوتي نحصل عليه نتيجة تفكك الحمض الأميني التريبتوفان بالجراثيم، وتكمن أهمية هذا الاختبار في أن عدداً قليلاً فقط من الجراثيم يمكنها أن تقوم بذلك، وليس من الضروري استعمال التربتوفان النقي في

وسط الاختبار، ولذلك يستعمل عادة التريبتون الناتج عن هضم بعض البروتينات والحاوي نسبة مرتفعة من التربتوفان.

ويمكن إجراء الاختبار بزرع الجراثيم على وسط الماء الهضموني العادي أو الغني بالتريبتوفان، فإذا كانت تنتج Tryptophanase ستعمل على تفكيك التريبتوفان وإنتاج الإندول، وبعد زرع الجراثيم يمكن الكشف عن الإندول بكاشف إرلخ – كوفاكس Ehrlich – Kovacs وهو بارا دي مِتيل أمينوبنزألدهيد Paradimethylaminobenzaldehde.

حيث نضع بضع قطرات من الكاشف على الأنبوب المزروع بالجراثيم فنلاحظ تكوّن حلقة حمراء شديدة نوعية دالة على تحرر الإندول على سطح الأنبوب (الشكل٥٤).

ملاحظة:

إن إضافة أحد السكريات القابلة للتخمر من قبل الجراثيم يمكن أن يعوق هذا الاختبار؛ لأن سرعة تكوّن الحمض بدءاً من السكريات سيؤدي إلى تثبيط الإنزيمات المحللة للبروتينات.

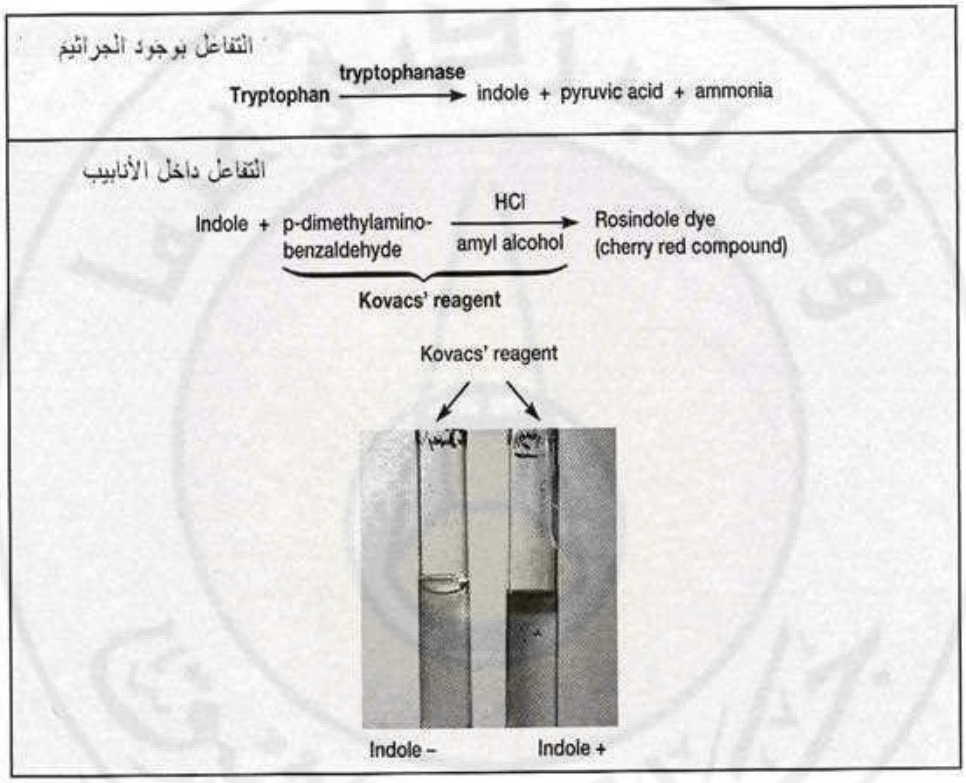
المواد والأدوات اللازمة:

- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 –48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- أنابيب اختبار حاوية وسط الماء الهضموني المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).
- كاشف إرلخ – كوفاكس Ehrlich – Kovacs .

طريقة العمل :

1- اكتب على الأنابيب (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي).

2- لقّح الأنابيب الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها.



الشكل 54 اختبار إنتاج الاندول

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 24–48 ساعة.

4- بعد مدة الحضن، أخرج الأنابيب من الحاضنة، وضَعْ فوق كل أنبوب قطرة من كاشف إرلخ – كوفاكس. سجّل النتائج.

- من الجراثيم إيجابية إنتاج الاندول *E . coli*.
- من الجراثيم سلبية إنتاج الاندول *Klebsiella – Salmonella* .

٤ – اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين

يقوم بعض الجراثيم بتخريب الحموض الأمينية الكبريتية مثل السيستئين لتحرير غاز H_2S كما في التفاعل الموضح: الشكل 82.

ومن أمثلة ذلك ما يحدث عند فساد البيض وبعض اللحوم المحفوظة أو المعلبة، وفي حال اللحوم المعلبة عادة يتفاعل الغاز الناتج مع معدن العلبة ليكوّن لوناً أسودَ مميزاً.

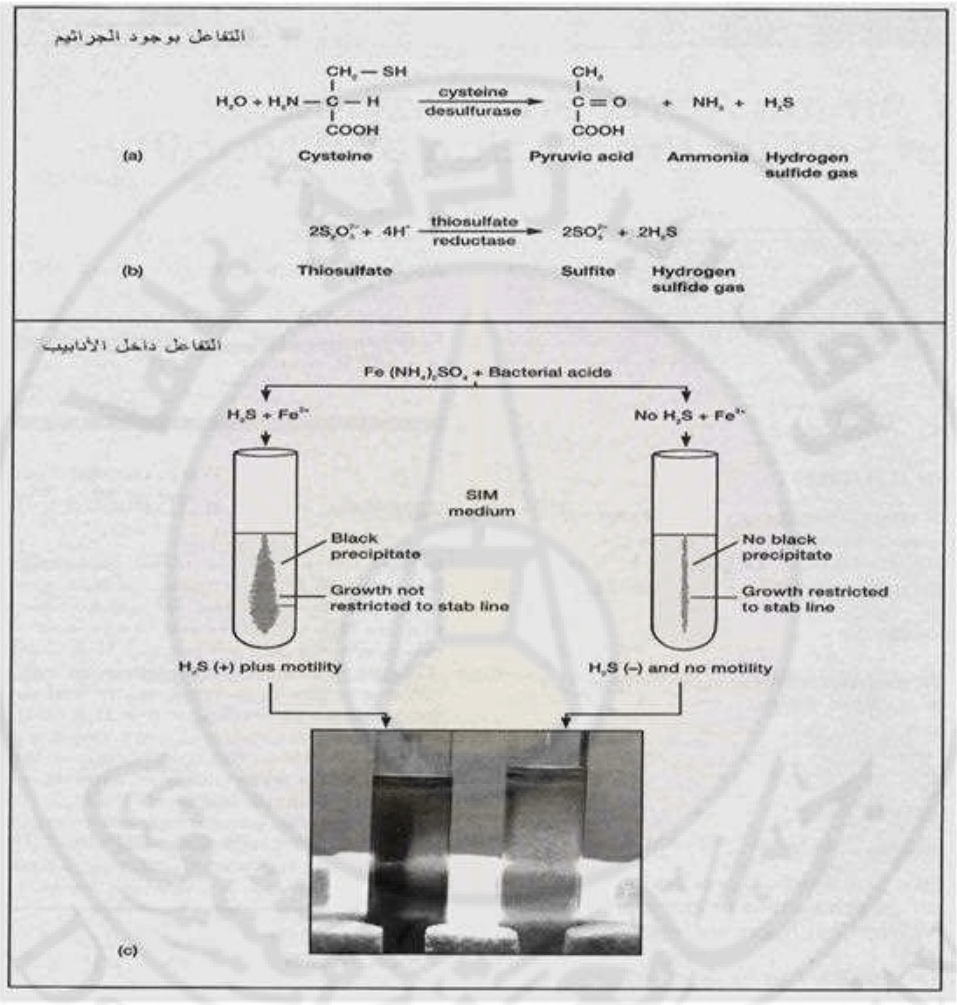
ويمكن إيضاح هذه الظاهرة في المزارع الجرثومية في المختبر باستعمال أوساط تحتوي على أملاح معدنية لبعض العناصر مثل البزموت أو الحديد أو الرصاص حيث يتكوّن كبريت المعدن ذو اللون المميز، مثال: تحت خلات الرصاص يتحول إلى كبريت الرصاص الأسود بعد تفاعله مع غاز H_2S، وكبريتات الحديد تتحول إلى كبريت الحديد أسود اللون بعد تفاعلها مع H_2S (الشكل ٥٥).

هناك عدة أوساط تفي بالغرض يمكن استعمالها ومنها وسط S . S agar (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

المواد والأدوات اللازمة

- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 –48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

- أطباق بتري حاوية وسط S . S المعقم.



الشكل 55 اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين

الأنبوب على اليمين سلبي (عدم تشكل H_2S) – الأنبوب على اليسار إيجابي (تكوّن اللون الأسود يعني إنتاج H_2S).

طريقة العمل:

1- اكتب على الأطباق (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي) .

2- لقّح الأطباق الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط.

3- ضع الأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م مدة 24 –48 ساعة.

4- بعد مدة الحضن، أخرج الأطباق من الحاضنة، واقرأ النتيجة بظهور اللون الأسود.

5- سجّل النتائج.

– من الجراثيم إيجابية إنتاج غاز H_2S *Proteus – Salmonella*

– من الجراثيم سلبية إنتاج غاز H_2S *E . coli* .

ج – اختبارات متفرقة:

١– النمو على وسط لا يحتوي إلا على الكربون اللاعضوي (وسط سيمون Simmon) (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية)

وسط صنعي يكون فيه المصدر الوحيد للكربون هو سيترات الصوديوم، وإن الجراثيم التي يمكنها أن تفكك السيترات هي وحدها فقط يمكنها استعمال الكربون من الوسط لإنتاجها السيتراز Citrase ثم يمكنها أن تنمو على هذا الوسط وتقلونه (تجعله قلوياً) وفق التفاعل الوارد في الشكل ٥٦.

إن الوسط يحتوي مشعر أزرق البروموتيمول الذي يكون أخضر مزرقاً في الوسط المعتدل، ويصبح أزرق اللون في الوسط القلوي، وأصفر في الوسط الحمضي.

إن نمو الجراثيم في هذا الوسط يؤدي إلى ارتفاع قيمة pH، مما يؤدي إلى تغير لون المشعر الموجود في الوسط إلى اللون الأزرق، وتكون الجراثيم في هذه الحالة قادرة على استعمال السيترات مصدراً للكربون والطاقة (الشكل ٥٦).

ملاحظة: أحياناً تنمو الجراثيم على وسط سيمون دون أن تقلب اللون، عندها يكون الاختبار إيجابياً.

ملاحظة: نزرع عادة هذا الوسط بدءاً من مزروع الجراثيم المعزول على أوساط صلبة، وليس من مزرعة سائلة مثل المرق المغذي أو الماء الهضموني لاحتوائها على مصادر عضوية للكربون من شأنها أن تغير النتائج.

المواد والأدوات اللازمة:

- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 – 48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- أطباق بتري أو أنابيب بالوضع المائل حاوية على وسط سيمون المعقم.

طريقة العمل:

١- اكتب على الأطباق (اسمك – الفئة – النوع الجرثومي).

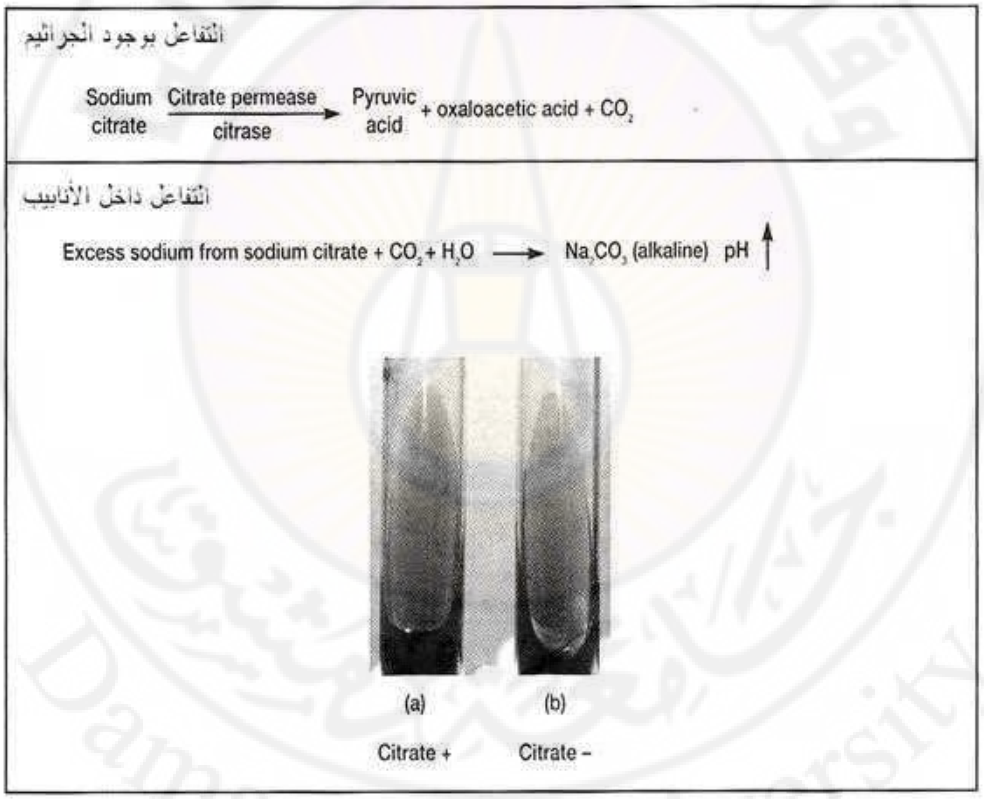
٢- لقح الأطباق والأنابيب الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط.

3- ضع الأنابيب والأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة37°م مدة 24 -48 ساعة.

4- بعد مدة الحضن، أخرج الأطباق والأنابيب من الحاضنة واقرأ النتيجة بظهور النمو وانقلاب اللون.

5- سجّل النتائج .

- من الجراثيم التي يمكنها النمو على وسط سيمون *Klebsiella*
- من الجراثيم التي لا يمكنها النمو على وسط سيمون *E.coli*.



الشكل 56 اختبار إمكان النمو على وسط سيمون.

٢- اختبار نشاط الكَتالاز Catalase:

تحتوي بعض الجراثيم على الكتالاز وهذه الإنزيمات ضرورية لنمو الجراثيم الهوائية، حيث تفكك الماء الأُكسجيني إلى ماء وأُكسجين غازي وفق التفاعل:

$$H_2O2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2 \uparrow$$

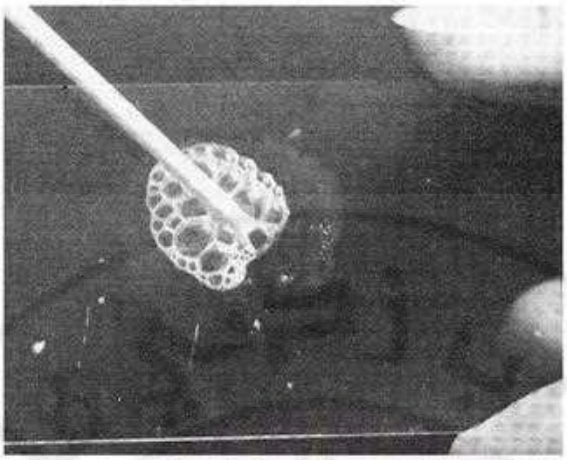
ويمكن ملاحظة انطلاق الأُكسجين عند إضافة بضع قطرات من الماء الأوكسجيني بتركيز 3 -4% إلى المزارع الجرثومية. وهذا الاختبار مهم للتمييز بين الجراثيم العنقودية إيجابية الغرام (إيجابية الكتالاز) والعقدية (سلبية الكاتالاز).

المواد والأدوات اللازمة:

- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 -48 ساعة.
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.
- صفائح زجاجية نظيفة.
- ماء أكسجيني بتركيز 3 -4%.

طريقة العمل:

1- ضع جزءاً من المستعمرة الجرثومية بإبرة الزرع الجرثومية على صفيحة نظيفة، وضع فوقها قطرة من الماء الأُكسجيني. لاحظ انطلاق فقاعات الأُكسجين مباشرة في حال إيجابية التفاعل (الشكل٥٧).



الشكل 57 اختبار الكتالاز : تشكل فقاعات الأكسجين دليل الإيجابية

أو ضع قطرة الماء الأُكسجيني مباشرة على طبق يحتوي الجراثيم المراد اختبارها، شريطة ألا تكون مزروعة على وسط يحتوي الدم؛ لأن الدم يتضمن الكتالاز، وعندها يكون الاختبار إيجابياً حتماً، ولكن بعد 10 ثوان.

2- سجّل النتائج.

جامعة دمشق Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفصل الحادي عشر

الجراثيم الممرضة
Pathogenic Bacteria

العلاقة بين المضيف والجراثيم:

١ – **الارتمام Saprophytism:** حالة تعيش فيها الجراثيم والإنسان على نحو مستقل كل طرف عن الآخر بالرغم من وجود الجراثيم على سطح الجلد وأجواف الجسم المفتوحة، وتسمى بالجراثيم الرمامة.

٢ – **التطاعُم Commensalim:** حالة تتكاثر فيها الجراثيم الموجودة على جلد ومخاطيات الإنسان على حساب المنتجات الناجمة عن الاستقلاب الخلوي وتسمى المجموع الجرثومي الطبيعي المطاعم.

للجراثيم المطاعمة دور كبير في المقاومة بإسهامها في تركيب بعض الأضداد التي تساعد على الدفاع عن العضوية ضد العوامل الممرضة الأخرى.

٣ – **الإمراضية Pathogenicity:** حيث تأخذ الجراثيم الممرضة ما تحتاجه لنموها وتكاثرها من العضوية التي تعيش عليها مع إحداث تأثيرات ضارة مختلفة في هذه العضوية؛ مما يسبب الأذية وإحداث المرض عندما تعجز دفاعات الجسم عن صدها.

يحدث المرض عندما تنمو الجراثيم على حساب نسج العضوية، أو عندما يفرز ذيفاناً Toxin خارجياً أو داخلياً.

- هناك جراثيم ممرضة نوعيّة (إمراضيتها محددة من الناحية السريرية والفيزيولوجية)، مثل: الحمى التيفية، وجراثيم ممرضة غير نوعيّة (تختلف أعراض إمراضيتها حسب مكان الإصابة).

- هناك جراثيم إجبارية الإمراضية، مثل: السلمونيلّة، لا يمكنها التكاثر خارج بؤرة الخمج وليس لها حملة أصحاء، ووجودها يعني وجود المرض. وجراثيم مخيّرة الإمراض تعيش على العضوية دون إحداث المرض ولكن بظروف معينة تحدث المرض.

- يمكن لبعض الجراثيم الرمية أو المطاعمة أن تسبب المرض في ظروف خاصة، مثل نقص المناعة أو وصول الجراثيم إلى أماكن عقيمة من الجسم، تسمى عندها الجراثيم الانتهازية أو المؤاكلة.

تشخيص الجراثيم الممرضة:

يتم التشخيص وفق طريقتين:

١- **طريقة مباشرة:** يتم فيها عزل الجراثيم أو أحد مكوناتها ثم تعريفها بطرائق مختلفة منها:

- الفحص المجهري.
- الزرع والعزل.
- دراسة الصفات الحيوية والصفات الحيوية الكيميائية.
- استعمال التقانات البيولوجية الجزيئية (تحديد DNA).

٢ – **طريقة غير مباشرة:** تعتمد على البحث عن أضداد الجراثيم، أي الكشف عن الاستجابة المناعية التي قام بها الجسم تجاه الجراثيم، ولها طرائق كثيرة.

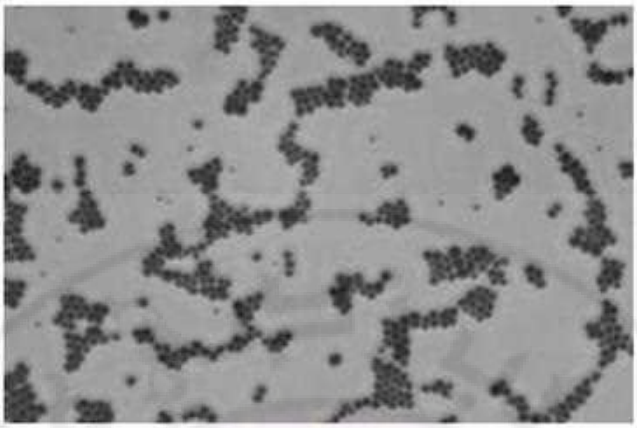
المكورات إيجابية الغرام Gram Positive Cocci

العنقوديات الذهبية Staphylococcus aureus:

من الجراثيم الممرضة اللانوعيّة تنتمي إلى فصيلة المكيرات Micrococcaceae وهي مسؤولة عن العديد من الأخماج وخصوصاً عند اضطراب المناعة أو عند حدوث أذية في النسج مثل الرض– الجرح –الحرق. تسبّب الدمامل – الداحس – الخراجات – خمج الدم – التهاب العظام والنقي – كما تسبّب بعض التسممات الغذائية.

خصائصها الحيوية:

واسعة الانتشار لأنها مقاومة للجفاف والملوحة (تشاهد عند ٣٠ – ٤٠% من الأفراد الأصحاء الذين يحملون العنقوديات الذهبية على الجلد وفي الأنف). هي مكورات إيجابية الغرام قطرها ١ ميكرون، تجتمع على هيئة عنقود يصل عدد المكورات في العنقود إلى ٥٠ مكوّرة (الشكل ٥٨)، هوائية اختيارياً تنمو بسهولة على الأوساط العادية، تشكلُ صباغاً أصفر يميزها بعد ٢٤ – ٣٦ ساعة من استزراعها، تعكر المرق المغذي على نحو متجانس.



الشكل 58 المكورات العنقودية إيجابية غرام، كما تبدو تحت المجهر

خصائصها الحيوية الكيميائية:

- تمييع الهلام (الجيلاتين).
- تنمو على وسط شابمان وهو وسط ذو تركيز ملحي عالٍ (٧ – ١٠% NaCl) مع المانيتول وحمرة الفينول. وتقلّب لونه من الأحمر إلى الأصفر؛ لأنها تخمر سكر المانيتول(الشكل٥٩).
- تنتج إنزيم المخثّراز Co agulase .
- تنتج إنزيم الفُسفاتاز Phosphatase .
- تنتج إنزيم ديزوكسي ريبو نكلياز Desoxyribonuclease الحالة للدنا DNA .
- تفرز حالة دموية من النوع (بيتا) β .

الاختبارات المطلوبة:

- زرع على وسط شابمان.

- الكشف عنها مناعياً عن طريق إضافة أضداد معلومة حيث يحدث التراص بين الأضداد ومولدات الضد المفترض وجودها في الجرثوم.

ملاحظة: تفيد هذه الخصائص في تمييز العنقوديات الذهبية عن أنواع العنقوديات غير الممرضة.

الشكل 59 يبين نمو العنقوديات الذهبية عند زرعها على وسط شابمان

العصيات سلبية الغرام Gram Negative Bacilli

فصيلة الأمعائيات Enterobacteriaceae

تضم هذه الفصيلة حوالي ١٠٠ جنس منها ٢٥ جنساً ممرضاً للإنسان، من أهم صفاتها:

هوائية مخيرة، عصوية الشكل سالبة غرام غير متبوغة، بعضها متحرك بسياط وبعضها يحتوي محفظة، تنمو على الأوساط العادية فهي سهلة الزرع لعدم حاجتها لعوامل نمو، تخمر الغلوكوز مع إطلاق غاز أو من دونه، ترجع النترات

إلى نتريت، لا تحتوي على إنزيم الأُكسيداز، تسكن في الأمعاء فهي مقاومة لأملاح الصفراء، وتوجد في الوسط الخارجي (ماء – هواء – تراب) نتيجة التلوث، منها إجبارية الإمراض، ومنها انتهازية، ومنها الممرضة النوعيّة وغير النوعيّة، مثال:

- **العصية القولونية: جنس الإشيريكية *Escherichia* – النوع *E.coli*:**

الإشيريكية القولونية تسكن الأمعاء وتكوّن ٨٠ % من الجراثيم الهوائية فيها.

تنتشر في البيئات المختلفة وتكون دليلاً على التلوث بمياه الصرف المنزلي، كما توجد في مخاطيات الإنسان وتنتقل إلى الأغذية.

ينتمي إليها نحو ١٧٠ نوعاً، منها فقط ٢٠ نوعاً قادراً على إحداث المرض، تكون مسؤولة عن الإنتانات البولية والتناسلية والهضمية والتهاب المسالك الصفراوية وبنسبة أقل خمج الدم والتهاب السحايا ولاسيما عند الأطفال.

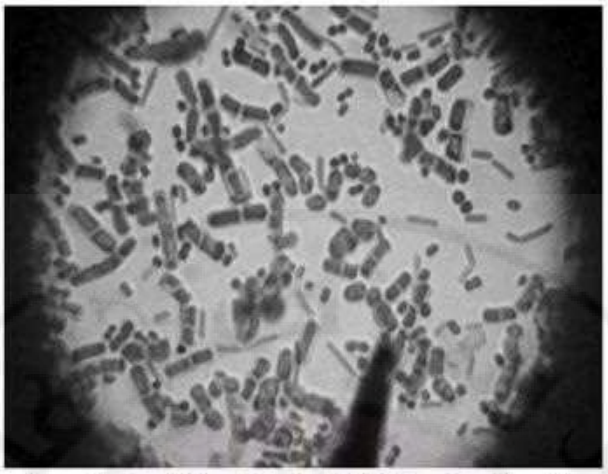
خصائصها:

عصيات بطول ١ – ٣ ميكرون وعرض ٠,٥ ميكرون مدورة النهاية – غير متبوغة –لا تحتوي محفظة – ٧٥% منها متحرك بسياط محيطية– مفردة أو مزدوجة وأحياناً سلسلية – سلبية الغرام ذات تلون قطبي (الشكل ٦٠).

صفاتها الحيوية:

حساسة للحرارة، تموت خلال ساعة في درجة ٥٦ °م.

حساسة للكلور، تقاوم حمض الفينيك ١%.



الشكل 60 جراثيم *E.coli* سلبية غرام ذات تلون قطبي، كما تبدو تحت المجهر

صفاتها الحيوية الكيميائية:

- تخمر الغلوكوز مع إطلاق غاز.
- تخمر اللاكتوز مع إطلاق غاز خلال ٢٤ ساعة.
- تحرر الإندول.
- سلبية فوكس بروسكاور وإيجابية حمرة المِتيل.
- لا تميع الهلام.
- لا تطلق غاز H_2S.
- لا تفكك البولة.

لا تنمو على وسط سيمون بالسترات.

أوساط تعريف *E.coli* :

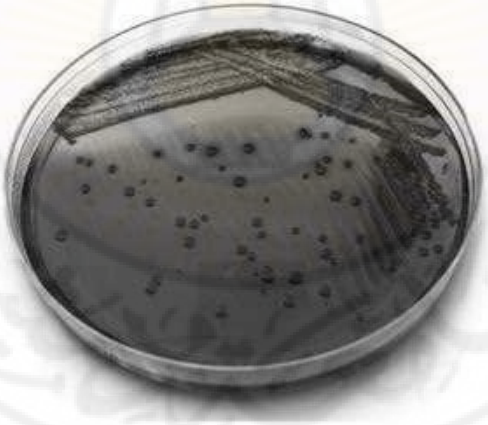
وسط ماكونكي Mac Conkey

وسط Violet-Red-Bile V.R.B

وسط E.M.B Eosine-Methylene bleu من الأوساط الاصطفائية وهو من أهم الأوساط وأكثرها استعمالاً، يحتوي على اللاكتوز والسكروز ومشعراً لونياً إضافة إلى الإيوزين وأزرق المِتلين والأملاح الصفراوية. تنمو عليه جميع أفراد الأمعائيات ولكن الـ *E.coli* تظهر على هيئة مستعمرات بنفسجية مائلة للسواد ذات لمعة يودية(الشكل ٦١).

– على المرق المغذي: تعكّره على نحو متجانس مع ظهور لمعة حريرية عند خض الأنبوب مع وجود راسب رمادي اللون وطهاوة على السطح وانطلاق رائحة برازية.

– على الآغار المغذي: مستعمرات مدورة منتفخة قليلاً ذات لون أبيض رمادي، قطرها ٢ مم لها رائحة برازية، ملساء من النمط S وأحياناً خشنة من النمط R .



الشكل 61 يبين نمو *E.coli* عند زرعها على وسط EMB

* العصية التيفية ***Salmonella*** :

يوجد منها نوعان هما:

الحمى التيفية *Salmonella typhi*

الحمى نظيرة التيفية *Salmonella partyphi*

عصيات إجبارية الإمراض لا توجد على نحو مُطاعم إلا في حالات النقاهة، نوعية الإمراض تسبب الحمى التيفية وتسبب أيضاً التسممات الغذائية.

تنتشر في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوانات ويمكن أن توجد في البيئة بسبب التلوث، لكن لا يمكنها التكاثر رغم أنها تقاوم وتحفظ على بقائها في التربة عدة أسابيع وأحياناً عدة شهور إذا كانت الحرارة والرطوبة مناسبة.

صفاتها:

عصيات مستقيمة طولها نحو ٣ ميكرون وعرضها ٠,٥ ميكرون، عديمة المحفظة، متحركة بسياط محيطية، تكون مفردة أو مزدوجة أو متكتلة في كتل صغيرة، سلبية الغرام، هوائية مخيرة.

الخصائص الحيوية:

تتأثر بالحرارة (تموت خلال ساعة بالحرارة ٥٦ °م). تتأثر بالمطهرات، تقاوم البرودة والتجمد، تقاوم بعض الملونات، تقاوم أملاح الصفراء وسترات البزموت وسيلينيت الصوديوم، وهذه الخاصة تفيدنا بعزلها.

الخصائص الحيوية الكيميائية:

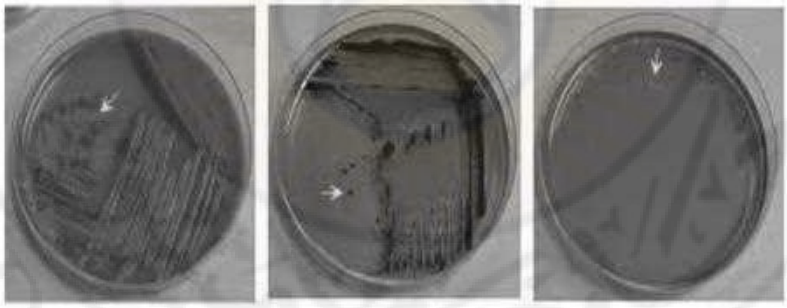
أهم صفة من صفاتها أنها لا تخمر سكر اللاكتوز وتنتج غاز H_2S، كما أنها

لا تحرر الإندول ولا تميع الهلام ولا تفكك البولة، تخمر الغلوكوز مع إطلاق غاز وتخمر المانيتول، تفاعل حمرة المِتيل إيجابي وفوكس بروسكاوير سلبي.

تعريفها:

تنمّى على وسط سيلينيت الصوديوم السائل بغية إكثارها وعزلها عن باقي الإمعائيات وذلك خلال ١٨ ساعة بعد الزرع حتماً. وتعزل ثانية على وسط S.S وهو وسط خاص (اصطفائي) للسلمونيلّة والشيغلّة *Salmonella - Shigella* ويحتوي اللاكتوز وأملاح الصفراء وسيترات الحديد والخضرة اللامعة.

الجراثيم غير المخمرة للاكتوز (مثل السلمونيلّة والشيغلّة) تنمو على هذا الوسط على هيئة مستعمرات شفافة، أما المستعمرات المخمرة فتكون وردية اللون. الجراثيم المنتجة لغاز H_2S تظهر لوناً أسود في مركز المستعمرة مثل السلمونيلّة أما الشيغلّة فلا تعطي اللون الأسود لأنها لا تطلق غاز H_2S (الشكل ٦٢).



الشكل 62 يبين نمو كلاً من *Salmonella - Shigella* –*E.coli* عند زرعها على وسط S.S

الفصل الثاني عشر

الفطريات Fungi

الفطريات Fungi أحياء حقيقية النواة توضع ضمن المشريات Thallus تفتقر لليخضور؛ لذلك تعيش حياة رمية أو طفيلية أو متعايشة، بعض أنواعها وحيد الخلية كالخمائر ولكن معظمها عديد الخلايا ذو بنية خيطية، يسمى الخيط الفطري Hypha ومجموعة الخيوط الفطرية يسمى الأُفطورة (المشيجة) Mycelium، وبعضها يكّون أنماطاً مختلفة من الأنسجة الفطرية قد تكون بسيطة أو معقدة.

الخيط الفطري إما أن يكون لاحاجزياً ذا بنية أنبوبية مثال الفطريات الدنيا، أو يكون مقسماً بحواجز إلى خلايا وحيدة النواة، أو عديدة النواة مثال الفطريات الراقية.

تخترق الأُفطورة (المشيجة)الإعاشية الوسط الذي تعيش فيه وترسل خيوطاً أو ممصات (في حال الفطريات الممرضة) للحصول على غذائها، وتكوّن غالباً أفطورة (مشيجة) هوائية تحمل عليها بُنى تكاثرية.

توجد في كل البيئات الأرضية، التربة والماء (الفطريات الكونيدية) وفي الهواء (أبواغ الفطريات). تعيش حياة رمية أو طفيلية (على النباتات والحيوانات والإنسان) أو متعايشة (مع جذور النباتات الراقية لتكوين الفطريات الجذرية

Mycorrhizae أو مع الطحالب لتكوين الأشن Lichens)، ومنها ما هو مفترس للديدان ولحيوانات أخرى في التربة.

أهمية الفطريات – فوائدها ومضارها:

تشكل الفطريات مجموعة مهمة للبيئة وللإنسان، رغم وجود أنواع كثيرة تسبب أضراراً متعددة.

تأتي أهمية الفطريات من كون بعضها قادراً على تفكيك المواد العضوية في التربة كما أنها تدخل في الدورات الحيوية والجيولوجية الكيميائية للعناصر مثل دورتي الكربون والآزوت فتزيد من خصوبة التربة، كما أن الفطريات الجذرية لها دور كبير في تحسين امتصاص النبات للعناصر المغذية.

وتمتلك بعض الفطريات مقدرة كبيرة على إنتاج مركبات مختلفة مهمة في الصناعات الغذائية (مثل الخمائر) وفي مقدمتها خميرة الخبز Saccharomyces cervisiae كما يستخدم فطر Penicillium roqueforti في تحضير بعض أنواع الجبن.

وتستعمل الفطريات في الصناعات الكيميائية (مثل إنتاج حمض الليمون والكحول)، وبعضها منتج للصادات الحيوية والعقاقير الطبية وإنتاج البروتين.

وتسبب بعض الفطريات الأخرى الأمراض للإنسان والحيوان والنبات، عن طريق المهاجمة المباشرة لهذه الأحياء أو عن طريق السموم الفطرية التي تفرزها مثل فطر Aspergillus flavus.

أشكالها:

تمثل الفطريات من الناحية الشكلية مجموعة عديمة التجانس لدرجة كبيرة، فمنها مفردة الخلية ومنها ما هو على هيئة خيوط كالزقية ومنها ما يمتلك بُنى معقدة كالدعاميات، فالفطريات تختلف كثيراً في التفاصيل البنيوية.

التكاثر Reproduction:

يمكن للفطريات أن تتكاثر بطريقة لاجنسية أو جنسية.

التكاثر اللاجنسي: يتم التكاثر اللاجنسي بطريقين أساسيين:

- التكاثر الإعاشي : يكون إما بالتفتت حيث تتجزأ المشيجة الفطرية إلى قطع لتعطي أفراداً جديدة، مثال الفطريات الابتدائية والزقية والدعامية، أو بالبرعمة ويلاحظ عند بعض الخمائر حيث تأخذ خلاليا الفطر شكلاً بيضوياً أو كروياً وتشكل البراعم التي لا تلبث أن تنمو وتنفصل عن الخلية الأم، وقد تبقى هذه البراعم متصلة مع بعضها لتشكل خيطاً فطرياً كاذباً. أو بالانشطار الذي يحدث في الفطريات وحيدة الخلية كما في الخمائر حيث تستطيل الخلية ثم تنقسم نواتها إلى نواتين، ويتشكل حاجز في وسط الخلية يفصل الخلية إلى خليتين. أو بتشكيل أشكال جذيرية عبارة عن تجمع بعض الخيوط الفطرية لتبدي تمايزاً كبيراً وواضحاً في نسجها وتكون مقاومة للظروف البيئية السيئة، ولها المقدرة على العودة للنمو في الظروف الملائمة. أو بتشكيل أجسام قاسية عبارة من تجمع خيوط فطرية ممتلئة بالمواد الادخارية، تتشكل في الظروف السيئة ولها المقدرة على الإنتاش عند عودة الظروف المناسبة.

- التكاثر بتشكيل أبواغ لاجنسية: هناك عدة أنماط للأبواغ اللاجنسية، فقد تكون داخل أكياس بوغية وتكون إما أبواغ سابحة (مسوّطة) أو أبواغ ساكنة(غير مسوّطة). وقد تتكون مباشرة على سطح الخيوط الفطرية أو في قمم سويقات تدعى حوامل الأبواغ الكونيدية وتدعى بالأبواغ الكونيدية فهي لا تتكون ضمن أكياس. أما الأبواغ الكلاميدية(المغطاة) فتتشكل بانفصال أجزاء من المشيجة الفطرية نهائية أو بينية، وتكون غنية بالمدخرات الدهنية وذات غلاف ثخين.

التكاثر الجنسي: يتضمن اندماج خليتين بالانصهار البلاسمي ثم النووي يليه انقسام منصف. ويقود هذا التكاثر إلى تشكيل أبواغ ذات أهمية في بقاء الفطر واستمراريته أكثر من أهميتها في انتشار الفطر كالأبواغ البيضية المتشكلة عن اندماج نواة من المنطفة ونواة بيضة كروية. والأبواغ الازدواجية، تتشكل من اقتراب خيطين فطريين من سلالتين مختلفتين وانصهارهما. والأبواغ الزقية، تتشكل داخل زقاق نتيجة انصهار نووي متبوع بانقسام منصف. والأبواغ الدعامية، التي غالباً ما ترتبط إلى الدعامة بزائدة.

عزل الفطريات الدقيقة من التربة وإحصاؤها

أ- الإحصاء باستعمال الشريحة الملامسة:

١- اغمس عموديا في دورق من تربة الحديقة ٢-٤ شرائح مجهرية نظيفة واترك ٢سم على الأقل بارزة فوق سطح التربة (اغمس ٣/٤الشريحة بالتربة).

٢- أضف كمية كافية من الماء حول الشريحة. ثم لا تقم بسقاية التربة لأكثر من أسبوع.

٣- قم بإزالة الشريحة بإمالتها للخلف بحيث لا يتم كشط الجزء العلوي من الشريحة.

٤- تخلص من أي جزيئات كبيرة من التربة وقم بتنظيف الجزء السفلي من الشريحة بمنشفة ورقية رطبة. اترك الشريحة لتجف تماما.

٥- اغمر الشريحة بمحلول حمض الخل ٤٠٪ acetic acid مدة ١- ٣ دقائق.

٦- أزل الحمض بالماء، مع الحرص على عدم تخريب الخلايا.

٧- اغمر الشريحة بمحلول phenolic Rose Bengal stain لمدة ٥-١٠ دقائق.

٨- اغسل الشريحة بالماء لإزالة الفائض من الملون، اترك الشريحة لتجف.

٩- افحص الشريحة تحت المجهر. ابحث عن خيوط فطرية وجراثيم و Actinomycetes .

١٠-سجّل جميع الملاحظات.

بهذه الطريقة يمكن ملاحظة علاقة الأحياء الدقيقة ببعضها وخاصة الفطريات وترافقها مع حبيبات التربة وجذور النباتات.

ب- الإحصاء باستعمال الأطباق:

هناك أكثر من طريقة لإحصاء الفطريات الدقيقة في التربة بالأطباق، أهمها: الطريقة المباشرة (الجافة) والطريقة غير المباشرة (الرطبة).

وفي كلتا الطريقتين يجب مراعاة الآتي:

طريقة أخذ العينة: حيث تراعى شروط العقامة للأدوات المستعملة، ويجب تسجيل جميع المعلومات عن التربة (صفاتها، لونها، مكان أخذ العينة، قربها من نبات معين أو بعدها عن النباتات، عمقها).

طرائق نقل العينة: يجب أن تُنقل العينة مباشرة إلى المختبر والمحافظة عليها بحالة عقيمة وتُجرى الاختبارات فور الوصول إلى المختبر ما أمكن ذلك أو تحفظ العينة في البراد عند الدرجة ٤°م لحين إجراء الاختبارات ويجب ألا تطول مدة الحفظ عن عدة أيام.

١ – الطريقة الجافة المباشرة:

نأخذ ١ غ من التربة الخصبة بوساطة ملعقة معقمة ثم ترش (تذر) بشكل متجانس على سطح الطبق المصبوب بوسط مغذ معقم، أو يمكن نثرها على هيئة أكوام متفرقة على سطح الطبق مع مراعاة أن تتم الزراعة بجانب اللهب. يمكن عمل ٢–٣ مكررات للعينة الواحدة.

٢ – الطريقة الرطبة غير المباشرة:

نأخذ ١ غ من التربة ونعمل على تحضير التربة وذلك بإضافة ١٠ مل من الماء المقطر المعقم أو الماء الفيزيولوجي المعقم أو نأخذ ١٠ غ من التربة ونضيف إليها ١٠٠ مل من الماء السابق مع السحق فنحصل على معلق التربة الذي نقوم بتخفيفه ثم زراعته بأحجام محددة على أوساط الاستزراع الخاصة.

ملاحظة: تُستعمل الطريقتان لعدّ الفطريات والجراثيم.

استزراع الفطريات وإحصاؤها في ١ غ من التربة بالطريقة الرطبة:

طريقة العمل:

١ – جهز أوساط مغذية خاصة للفطريات (أعفان)؛ أهم الأوساط المستعملة هي وسط شابيك أو وسط خلاصة الشعير أو وسط دكستروز البطاطا أو وسط سابورود آغار .(راجع دليل الأوساط الغذائية).

٢ – اضبط درجة pH الوسط على ٣.٥ لتمنع نمو الجراثيم المرافقة والتي تعيق نمو الفطر، ويكون ذلك بإضافة ١.٥ مل من حمض عضوي معقم (حمض العنب Tartaric acid أو حمض اللبن Lactic acid أو حمض الليمون Citric acid) بتركيز ١٠% لكل ١٠٠ مل من الوسط المغذي المصهور بدرجة ٤٥–٥٠° م. (لا يضاف الحمض إلى الوسط الساخن كي لا يتأثر الوسط المغذي) بعد ذلك امزج الوسط جيداً مع الحمض وصبه في أطباق معقمة وفارغة بشروط عقيمة واتركه حتى يتصلب.

يمكن إضافة صاد حيوي كالستربتوميسين إلى الوسط المغذي المصهور بدرجة ٤٥–٥٠°م لمنع نمو الجراثيم بدلاً من إضافة الحمض العضوي. (لا يضاف الصاد الحيوي على الوسط الساخن كيلا يتفكك الصاد الحيوي) ثم امزج الوسط جيداً مع الصاد الحيوي وصبه في أطباق معقمة وفارغة بشروط عقيمة واتركه حتى يتصلب.

٣– لأخذ عينة التربة، جهز أكياساً بلاستيكية معقمة، وسكيناً معقمة، ومسطرةً ومنكاشاً.

٤- سجّل ملاحظاتك المتعلقة بصفات التربة (الغطاء النباتي - مناخ - عمق العينة - المعالجة وغير ذلك).

٥- اعمل حفرة بعمق ١٠-١٥ في المكان المطلوب من التربة واجمع ثلاث عينات من كل مكان (حوالي ٢٥٠غ من التربة) مع الحرص على عدم أخذ العينة من التربة السطحية.

٦- قُمْ بإزاحة الحصي والبقايا النباتية كالجذور من العينة واسحق العينة جيداً بالهاون المعقم ثم قُمْ بعملية الاستزراع.

الاستزراع:

١ - اسحق ١٠غ من التربة بالهاون وصب فوقها بالتدريج مع السحق المستمر ١٠٠ مل من الماء الفيزيولوجي المعقم لتحصل على معلق التربة. اتركه ليرقد.

٢ - انقل بالماصة وعلى نحو عقيم ١ مل من معلق التربة إلى أنبوب يحتوي ٩ مل من الماء الفيزيولوجي المعقم، رجه جيداً لتحصل على التركيز $١٠^{-١}$ أو ١٠/١.

٣ - كرر العملية لتحصل على التراكيز $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ ، $١٠^{-٤}$ مع مراعاة تغير الماصة كل مرة وعدم غمس الماصة بالسائل.

٤ - خذ من التراكيز $١٠^{-٢}$ ، $١٠^{-٣}$ ، $١٠^{-٤}$ مقدار ٠.٥ مل وضعها فوق سطح طبق يحتوي الوسط المغذي المحمض أو المضاف إليه صاد حيوي وافرشها على سطح الطبق بوساطة ماسحة معقمة (ملوقة)، اترك الطبق حوالي

نصف ساعة حتى يتشرب كمية السائل، سجل على الطبق اسم العينة والتركيز والمكرر، احضن الطبق بالوضع المقلوب بالدرجة ٢٨°م لمدة ٣-٧ أيام.

اعمل ٢-٣ مكررات للتركيز الواحد.

٥ – بعد الحضن عد المستعمرات النامية على سطح الطبق واستنتج عدد الأبواغ الفطرية في ١ غ من التربة المدروسة كالآتي:

عدد الفطريات في١ غ من التربة= عدد المستعمرات × مقلوب نسبة التخفيف / وزن العينة

٦ – يمكن أن نسجل النتائج في جدول(الجدول ١١).

الجدول 11 نتائج عد الفطريات في التربة

التركيز	10^{-2}		10^{-3}		10^{-4}	
عدد المكررات	١	٢	١	٢	١	٢
عدد المستعمرات ×مقلوب نسبة التخفيف						
الوسطي لكل تركيز						
الوسطي العام						

الوسطي العام يمثل عدد الفطريات في ١غ من العينة

٧ – قم بعزل الفطريات النامية على سطح الوسط المغذي في أنابيب تحتوي أوساطاً مغذية على هيئة أرومات وذلك من أجل تحدد هويتها والقيام بتصنيفها.

تعزل الأنواع الفطرية على نحو نقي بعملية تخفيف اللقاح بطرائق عديدة، منها أن نأخذ على نحو عقيم بإبرة الزرع بعض الأبواغ من المستعمرة الفطرية المراد

تنقيتها ونلقح بها أنبوباً يحتوي الماء المعقم، نجانس الأنبوب ثم نضع بضع قطرات منه على سطح طبق جديد يحتوي وسطاً مغذياً مناسباً ونفرشها ونحضن الطبق بشروط مناسبة. نكرر العملية حتى نحصل على مستعمرات فطرية نقية. ثم نحفظها كأرومات للدراسة.

أهم الأنواع الفطرية في التربة هي من الفطريات الناقصة (التي لا تقوم بالتكاثر الجنسي)، وبعض أنواع الزقية من رتبة Euroticales ورتبة Hypocreales ورتبة Pleosporales وغيرها، وأنواع من الخمائر، وأنواع من الازدواجية خاصة رتبة Mucoriales وبعض البيضية والكتريدية.

تصنيف الفطريات:

لقد اختلف العلماء كثيراً عبر التاريخ في تحديد هوية الفطريات ومكانها التصنيفين لذلك تغيّر تصنيف الفطريات مرات عديدة.

بدأ تصنيف الفطريات بملاحظات اعتمدت على الشكل الخارجي والعين المجردة ثم على المجهر الضوئي؛ فأُخذ بالحسبان نمط الخيط الفطري، والمشيجة، وشكل البوغة، ونمط التكاثر الجنسي، ووجود وشكل البنيات التكاثرية، حيث كانت تقسم الفطريات إلى شعبتين رئيستين هما.

- **شعبة الفطريات المخاطية Myxomycota**
- **شعبة الفطريات الحقيقية Eumycota** التي تضم:

١ – تحت شعبة الفطريات السوطية Mastigomycotina

٢– تحت شعبة الفطريات الازدواجية Zygomycotina

٣ – تحت شعبة الفطريات الزقية Ascomycotina

٤ – تحت شعبة الفطريات الدعامية Basidiomycotina

٥ – تحت شعبة الفطريات الناقصة Deuteromycotina أو Fungi imperfecti

بعدها تم الاعتماد على الخصائص الكيميائية الحيوية إلى أن أصبح الاعتماد على الدراسات الجزيئية المتعلقة بالتتالي النكليوتيدي في جزيئات الحموض النووية كتصنيف John Webster & Roland W.S.Weber عام ٢٠٠٧، إذ يرى فيه الباحثون أن الفطريات تتبع لثلاث ممالك من حقيقيات النواة Eukaryota:

Protozoa: الأوالي الحيوانية: وتضم الفطريات المخاطية.

Straminipila: وتضم الفطريات البيضية.

Eumycota: الفطريات الحقيقية: وتضم الكيتريدية والازدواجية والزقية والدعامية.

بقيت المشكلة التي لم تؤخذ بالحسبان في تصنيف بعض الباحثين والمتمثلة بالفطريات التي لم يتضح لديها التكاثر الجنسي (سابقاً الفطريات الناقصة).

١ – شعبة الفطريات المخاطية Myxomycota :

أو العفنات المخاطية وهي تملك مرحلة إعاشية تتكون من كتلة بروتوبلاسمية حقيقية أو كاذبة، وتتكاثر عن طريق ثمار تعطي أبواغ ساكنة تعطي بعد إنتاشها خلايا أميبية تأخذ صفة الأعراس وتتحد مكونة البلاسموديوم.

٢- شعبة الفطريات البيضية Oomycota:

من الفطريات الدنيا، على الأغلب طفيلية، أعراسها مسوّطة، تكاثرها الجنسي من النمط البيضي (أعراس مختلفة بالشكل).

٣- شعبة الفطريات الكيتريدية Chytridiomycota:

ينمو معظم أفرادها هوائياً في التربة أو الدبال أو في الماء، مُشكّلة أبواغاً سابحة ذات سوط واحد خلفي أملس.

٤- شعبة الفطريات الازدواجية Zygomycota :

من الفطريات الدنيا، تتكاثر جنسياً بأبواغ ازدواجية (متماثلة بالشكل) ولا جنسياً بأبواغ تكون داخل أكياس بوغية، تتميز معظم أنواعها بمشيجة صوفية المظهر بعضها تملأ الفراغ الهوائي في طبق بتري منها الرمي وبعضها طفيلي.

٥- شعبة الفطريات الزقية Ascomycota

من الفطريات الراقية، تتكاثر جنسياً بالأبواغ الزقية الموجودة ضمن زقاق قد تكون عارية أو محمولة على ثمار زقية مختلفة الأنماط.

٦- شعبة الفطريات الدعامية Basidiomycota

من الفطريات الراقية، تتكاثر جنسياً بالأبواغ الدعامية المحمولة على دعامات مختلفة الأشكال قد تكون لا ثمرية أو محمولة ضمن ثمار.

معظم الفطريات الدقيقة التي تنمو فوق أطباق بتري (نمو رمي) تنتسب إلى الفطريات التي لم يتضح لديها التكاثر الجنسي(الناقصة) والازدواجية والزقية.

الفطريات الازدواجية:

تعيش في التربة، أغلب أفرادها رمية عفنية، المشيجة لاحاجزية غزيرة التفرع، أبواغها غير متحركة وتكون ضمن أكياس بوغية كبيرة أو صغيرة، يمكن أن تشكّل أبواغاً كلاميدية (مغطاة) Chlamydospores (خلايا بينية ذات جدار ثخين).

التكاثر الجنسي يحدث باتحاد أكياس عروسية متشابهة ، وتشكل الأبواغ الازدواجية الملقحة Zygospore أو مايسمى بالبيضة الملقحة Zygote (الشكل ٦٣).

الشكل 63 الأبواغ الازدواجية Zygospore أو مايسمى بالبيضة الملقحة Zygote

رتبة موكورواليز Mucorales

فصيلة موكوراسي Mucoraceae ندرس منها:

جنس *Rhizopus* : أو ما يسمى بفطر عفن الخبز أو العفن الأسود، تشكل المشيجة أرآد وجذريدات يخرج حامل الكيس البوغي مقابل الجذريدات، ويكون

متفرعاً و طويلاً وينتهي بعماد شكله يساعد على التصنيف (الشكلين ٦٤-٦٥)، يحمل الكيس البوغي عدداً كبيراً من الأبواغ سوداء اللون، للفطر مشيجة صوفية المظهر وتملأ الفراغ الهوائي في طبق بتري. يكوّن الأبواغ المغطاة.

الشكل 64 جنس *Rhizopus* كما يبدو تحت المجهر

الشكل 65 رسم توضيحي لجنس *Rhizopus*

جنس *Mucor*: تشكل المشيجة أرآد وجذريدات، يخرج حامل الكيس البوغي مقابل الرئد يكون غير متفرع وطويلاً وينتهي بعماد (الشكل ٦٦) شكله يساعد على التصنيف، يحمل الكيس البوغي عدداً كبيراً من الأبواغ رمادية اللون، للفطر مشيجة صوفية المظهر وتملأ الفراغ الهوائي في طبق بتري، يسبب تعفن المواد الغذائية. يكوّن الأبواغ المغطاة.

الشكل 66 على اليمين جنس *Rhizopus* ، على اليسار جنس *Mucor*

الفطريات التي لا تتكاثر جنسياً (الناقصة):

رميّة، ويمكن لبعض أفرادها أن تصيب النباتات سواء في الحقل أم في مستودعات التخزين.

تضم جميع الفطريات الخيطية التي تشكل أبواغاً لاجنسية فقط أو لاتشكل أبواغاً إطلاقاً (لا يعرف لها تكاثر جنسي، وفي حال عُرف لها تكاثراً جنسياً في شروط بيئية معينة، ينقل تصنيفها إلى الشعبة المناسبة؛ لذلك بعض أفرادها يأخذ أكثر من تصنيف).

حالياً يرى بعض الباحثين وضعها ضمن الفطريات الزقية.

الفطريات الزقية Ascomycota

رتبة Euroticales

فصيلة Trichocomaceae نذكرمنها:

جنس *Penicillium*: ويسمى بالفطر المكنسي وهو المسبب للعفن الأزرق على الحمضيات، أحياناً يكون طفيلياً على الإنسان والطيور. حوامل الأبواغ الكونيدية متفرعة (عدد الفروع وزوايا التفرع وعدد التفرعات كلها تساعد على تصنيفه) وحامل الأبواغ يحمل بنهايته زوائد قارورية تسمى فياليدات Vialids تحمل أبواغ كونيدية سلسلية التوضع (الشكلين ٦٧-٦٨).

الفطر المفرز للصاد الحيوي البنسلين هو *P.chrysogenum*.

Penicillium sp.

الشكل 67 جنس *Penicillium* كما يبدو تحت المجهر

الشكل 68 رسم توضيحي لجنس *Penicillium*

جنس *Aspergillus*: حوامل الأبواغ الكونيدية غير متفرعة وتنتهي بانتفاخ يحمل صفاً واحداً من الزوائد القارورية Vialids فيكون من النمط البسيط، أو

أنه يحمل صفين من الزوائد فيكون من النمط المركب. على الزوائد القارورية تُحمل الأبواغ سلسلية التوضع (الشكلين ٦٩-٧٠) وتكون الأبواغ ملونة بلون فاتح أو أسود. يخرج حامل الأبواغ الكونيدية من خلية قدمية.

الشكل 69 جنس *Aspergillus* كما يبدو تحت المجهر

الشكل 70 رسم توضيحي لجنس *Aspergillus*

رتبة Hypocreales

فصيلة Nectriaceae ندرس منها:

جنس *Fusarium* : المشيجة رقيقة وتحمل ثلاثة أنواع من الأبواغ هي الأبواغ الكونيدية الصغيرة بيضوية الشكل مكونة من خلية واحدة أو من خليتين محمولة على حوامل قصيرة، والأبواغ الكونيدية الكبيرة منجلية الشكل مكونة من عدة خلايا تُحمل على حوامل قصيرة والأبواغ المغطاة Clhamydospors التي تتشكل في الظروف البيئية السيئة وتوضعها بيني ضمن الخيط الفطري تكون ذات غلاف ثخين ومقاومة للظروف البيئية القاسية. على الطبق له شكل ومظهر القطن، يعيش في التربة حياة رمية لكنه يصيب العديد من النباتات في حال توفر المضيف ويسبب أمراض الذبول الفوزارية على عدد من النباتات مثل القطن والبندورة (الشكل ٧١).

الشكل 71 جنس *Fusarium*

رتبة Pleosporales

فصيلة Pleosporaceae ندرس منها:

جنس *Altenaria* : تُحمل الأبواغ على حوامل الأبواغ الكونيدية القصيرة نوعاً ما بشكل سلسلي، وتكون البوغة سوداء اللون ومتعددة الخلايا مخروطية الشكل أو بيضوية (الشكل ٧٢).

يعيش في التربة بشكل رمي ويكون طفيلياً في حال وجود المضيف، إذ يصيب نباتات الفصيلة الباذنجانية بمرض اللفحة المبكرة مما يسبّب تلف المحاصيل الزراعية. يظهر بشكل مخملي أسود في الطبق.

الشكل 72 جنس *Altenaria*

جنس *Stemphylium* : تُحمل الأبواغ على حوامل الأبواغ الكونيدية القصيرة نوعاً ما بشكل متفرع وتكون البوغة سوداء اللون ومتعددة. الخلايا كروية الشكل

ملساء أو مزودة بأشواك (الشكل٧٣). يعيش في التربة بشكل رمي ويصيب نباتات الفصيلة الباذنجانية، ويسبب بقعة الأوراق الرمادية في البندورة واللفحة الورقية في القطن. يظهر بشكل مخملي أسود في الطبق.

الشكل 73 جنس *Stemphylium*

الفصل الثالث عشر

الطحالبAlgae

مجموعة ضخمة ومتنوعة من حقيقيات النواة Eukarya متباينة الشكل والحجم والتشكل ونمط الحياة، تقوم بعملية التركيب الضوئي؛ لأنها تحتوي على اليخضور فهي ذاتية التغذية.

ملاحظة: يجب عدم الخلط بينها وبين الجراثيم الزرقاء Cyanobacteria التي تقوم أيضاً بعملية التركيب الضوئي لكنها تنتمي للجراثيم.

تسود الطحالب في الأوساط المائية، فهي تنتشر في هذه الأوساط على القاع، أو تبقى معلقة ضمن كتلة الماء، أو تطفو على سطحه، وتوجد أنواع تعيش في بيئات أخرى ولاسيما الترب الرطبة.

أهمية الطحالب – فوائدها ومضارها:

لها دور كبير في النظم البيئية، وبالدرجة الأولى النظم المائية حيث يكون دورها أساسياً، ويتمثل ذلك بمقدرتها على القيام بعملية التركيب الضوئي؛ مما يجعلها المجموعة المنتجة الحقيقية للمادة العضوية وللأكسجين الضروريين لتغذية الأحياء المائية وتنفسها.

وتظهر أهميتها في مجالات متعددة كالغذاء والزراعة والصناعة والطب.

كما أنها ذات فائدة كبيرة في عمليات تنقية مياه الصرف الصحي والمياه المعرضة للتلوث نظراً إلى إنتاجها الأكسجين الضروري لقيام الجراثيم الهوائية

بعملها في تفكيك المخلفات العضوية والتخلص منها، وهذا ما يسمى بالتنقية الذاتية للمياه والتي لا تحدث بغياب الطحالب.

تعدّ الطحالب مصدراً غذائياً مهماً غنياً بالفيتامينات، كما أنها مصدرٌ لتكوين البترول وغاز الميتان، بالإضافة لكون المتكلسة منها مصدراً للحجر الكلسي.

هذا واستعمل الكثير منها في الدراسات البحثية وكمخصبات للتربة، ولها استعمالات طبية وصناعية، وتعدّ دالات حيوية مهمة على نوعية المياه نظراً لحساسيتها الكبيرة تجاه تغيرات الشروط المحيطة بها، كنسبة الأكسجين المذاب في المياه وغزارة العناصر المغذية ووجود ملوثات سامة؛ فوجود هذا النوع أو ذاك من الطحالب يمكن أن يكون دليلاً على نظافة المياه أو تلوثها بالنفط أو دليل وجود عنصر معدني معين بتراكيز عالية.

بالمقابل للطحالب أضرار كثيرة، فقد تكون سبباً في إكساب الماء طعماً وروائح غير مرغوبة خاصة في محطات المياه، وقد تنتج مواد لزجة ويكون بعضها سماً. كما تغلق النموّات الغزيرة لطحالب *Chladophora* القنوات المفتوحة الصغيرة وتسبب فيضان المياه. وبعض الأنواع قد تؤدي إلى إغلاق مرشحات تصفية المياه وتخفيض تدفق المياه. كما أن النوع *Prymnesium parvum* المنتشر في أوربا وفلسطين ينتج خلايا إضافية سامة تقتل الأسماك. كما يتطفل بعض الطحالب على طحالب أخرى أو على نباتات راقية كالشاي أو القهوة.

أشكالها:

من الناحية المورفولوجية نلاحظ تسلسلاً واضحاً في المرور من الأنماط وحيدة الخلية السابحة إلى المستعمرات الصغيرة؛ فالمستعمرات الخيطية أو الصفيحية محدودة التمايز وصولاً إلى الأشكال الكلادومية المتطورة، والأشكال ذات النمو القمي التي يمكن أن تتمايز إلى ما يشبه الساق والأوراق.

تعرف الأنواع المجهرية بالطحالب الدقيقة، وتتضمن الطحالب النارية والذهبية والمشطورات والاوغلينات والطحالب الخضراء وكثيراً ما تضاف إليها الجراثيم الزرقاءCyanobacteria .

جمع الطحالب والعوالق النباتية وتحضيرها للدراسة وحفظها:

تختلف طريقة جمع الطحالب تبعاً لمكان وجودها وطريقة حياتها، فالقاعية الكبيرة تجمع باليد، أما العوالق والطحالب المجهرية فهناك صعوبة أكبر في جمعها، وتستخدم عادة شباك جمع العوالق (البلانكتون) مخروطية الشكل قاعدتها دائرية ذات العيون الدقيقة والمصنوعة من الحرير، ولكن على الرغم من ذلك فهذه الشباك لا تحتجز إلا نحو ١٠% من الأنواع الموجودة فعلاً، لأن أغلب الأنواع ذات خلايا مفردة صغيرة الحجم. لذلك يمكن أن نلجأ لأخذ العينة من الماء بقارورة خاصة ثم إجراء عملية الترسيب البطيء (الترقيد) أو الترشيح أو التثفيل بسرعة ٢٠٠٠ دورة / دقيقة، وهي طريقة تمكننا من الحصول على معظم الأنواع الموجودة في حجم معين من الماء.

تحفظ العينات أو تثبت (قتل الخلايا مع الإبقاء على محتوياتها وشكلها) تبعاً للغاية من الدراسة، وعموماً يكفي أن نضيف إلى العينات اللوغول ٤% أو الفورمول بنسبة ٥% .

أما الدراسة المجهرية فيمكن أن تكون بوضع قطرة من معلق الطحالب الحيّة أو المثبتة على الشريحة الزجاجية وفحصها مباشرة، إذا كانت مستعمرات صغيرة، وتقطع المستعمرات الخيطية إلى قطع صغيرة وتفحص تحت المجهر.

تتطلب دراسة المشطورات معاملة خاصة حيث يوضع على العينة الموجودة على الشريحة الزجاجية قطرة من حمض الأزوت وتسخن بهدوء حتى درجة الغليان للتخلص من المادة العضوية الموجودة داخل الدرع من أجل إظهار بنية الدرع.

ويمكن استعمال ملون الهيماتوكسيلين (راجع دليل الصبغات) لتلوين خلايا الطحالب عموماً في حال رغبنا في ذلك. ويتم التلوين وفق المراحل الآتية:

- اغسل العينات المثبتة بالماء المقطر.
- ضع العينات في محلول مائي من كبريتات الأمونيوم الحديدية بتركيز ٢% مدة ساعة.
- اغسل بالماء المقطر.
- أضف ملون الهيماتوكسيلين واتركها فيه مدة ١ – ٤ ساعات ثم اغسل بالماء المقطر.

استزراع الطحالب:

إن دراسة نوع معين من الطحالب تقتضى الحصول على أفراده بكمية كاف وعلى نحو نقي، ولتحقيق ذلك يجب أن نحقق شرطين هما عزل النوع المراد زرعه وتأمين شروط الاستزراع المناسبة:

- **عزل النوع المراد زرعه:**

يجب أولاً تأمين الشروط المناسبة لنموه وتكاثره ولاسيما اختيار الوسط المغذي المناسب الحاوي على معظم العناصر الضرورية لنمو وكذلك الإضاءة ودرجة الحرارة المناسبة.

وتختلف طريقة عزل الطحالب تبعاً لحجمها وطريقة معيشتها.

طحالب التربة: هي طحالب صغيرة الحجم أو مجهرية، تنمو في الفصل الرطب من السنة مكوّنة كتلاً هلامية كبيرة ونقية تقريباً مثال الجرثوم الأزرق *Nostoc* ، في هذه الحالة يكون عزلها سهلاً حيث يؤخذ جزء من المستعمرة ويزرع على وسط مغذ مناسب وتحضن بشروط مناسبة حيث تؤمّن الرطوبة والحرارة والتهوية والإضاءة المناسبة.

أما في حال الطحالب الأصغر حجماً والموجودة في التربة، فيمكن عزلها وتنميتها بنثر حبيبات التربة فوق سطح الوسط المغذي الأغاري على نحو متجانس، أو تحضير معلق مائي للتربة بتراكيز محددة (١/١٠، ١/١٠٠ ، ١/١٠٠٠ .....) ثم زرع ١ مل منه في وسط مغذي آغاري. وبعد حضنه

بالشروط المناسبة تنمو الأنواع الموجودة في التربة على الآغار على هيئة مستعمرات منعزلة؛ مما يمكننا من عزل كل نوع عن الآخر بسهولة، في مرحلة لاحقة ننقل عدداً من الخلايا إلى الوسط النهائي.

طحالب المياه: تحتوي العينات المأخوذة من الأوساط المائية الطبيعية (برك، بحيرات، أنهار، بحار) على أنواع مختلفة من الطحالب وأحياء دقيقة أخرى. ولهذا تكون الخطوة الأولى في عملية الاستزراع هي تعرُّف الأنواع الموجودة، ثم عزل النوع المطلوب، ويكون ذلك بأخذ عدة قطرات من العينة في زجاجة ساعة أو شريحة زجاجية وفحصها بالمكبرة ثم المجهر وعزل النوع المطلوب اعتماداً على الخاصة الشعرية حيث تلتقط خلايا النوع المطلوب بممص باستور مُدبَّب النهاية (بحيث لا يتجاوز قطر فتحته ٠.٢ مم)، توضع الخلايا المعزولة في وسط مغذ مناسب، وتحضن بشروط مناسبة لتتكاثر. تكرر هذه العملية عدة مرات للتأكد من عزل النوع المطلوب ونقائه.

- **شروط الاستزراع:**

يجب أن تأمين الشروط الأساسية والمعروفة في الدراسات الميكروبيولوجية، وأهمها:

- العمل على نحو معقم من حيث الأدوات والأوساط المغذية، ومنع أي تلوث جانبي.
- اختيار الوسط المناسب للنمو من حيث تركيبه الكيميائي.

- تحقيق الشروط البيئية المناسبة من ضوء وحرارة وغاز ثنائي أكسيد الكربون وغيرها.

تصنيف الطحالب:

تنتمي الطحالب إلى مملكة البروتستا Protista والأشكال البدائية منها (الزرقاء) تنتمي مع الجراثيم إلى بدائيات النواة Prokaryotae

يعتمد تصنيف الطحالب على الخصائص الأساسية المميزة للمجموعات المختلفة منها، وعليه تقسم الطحالب إلى عدة شعب:

شعبة الطحالب الحمراء Rhodophycophyta

شعبة الطحالب النارية Pyrrophycophyta

شعبة الطحالب الذهبية Chrysophycophyta

شعبة المشطورات Bacillariophycophyta(Diatoms)

شعبة الطحالب الصفراء المخضرة Xanthophycophyta

شعبة الطحالب السمراء Phaeophycophyta

شعبة الطحالب الأوغلينية Euglenophycophyta

شعبة الطحالب الخضراء Chlorophycophyta

شعبة الطحالب الكارية Charophycophyta

قبل دراسة بعضاً من الطحالب صغيرة الحجم والمجهرية؛ سندرس الجراثيم الزرقاء بدائية النواة.

الجراثيم الزرقاء Cyanobacteria :

تضم أنواعاً بدائية النوى واسعة الانتشار في الطبيعة نظراً لمرونتها الاستقلابية العالية، وتسامحها الواسع مع الشروط الفيزيائية والكيميائية للوسط، كما أن متطلباتها الغذائية أبسط ما هو معروف في العالم الحي نظراً لمقدرتها على القيام بعمليتي التركيب الضوئي وتثبيت الآزوت الجوي معاً عند بعض الأجناس.

من حيث البنية والتعضي فهي تحتل مكاناً وسطاً بين الجراثيم والطحالب، فخلاياها صغيرة الحجم، بدائية النوى، لا تحتوي على صانعات (الأصبغة منحلة في السيتوبلاسما) لذلك تبدو متجانسة نسبياً تحت المجهر تغزر فيها الأصبغة. أما الأجناس التي تقوم بتثبيت الآزوت الجوي فإنها تحتوي على خلايا مختصة حاوية على أنزيمة النتروجيناز وتدعى بالحويصلات المتباينة أو المتغايرة heterocystis.

يمكن للخلايا أن توجد بشكل منفرد، أو تكون متعددة الخلايا فتشكل مستعمرات صغيرة مختلفة الأشكال، أو أنها تتألف من خيوط بسيطة أو متفرعة. نذكر من أجناسها:

Gleocapsa: مستعمرات صغيرة مؤلفة من ٢ – ٤ خلايا محاطة بغلاف هلامي مطبق (الشكل ٧٤).

Nostoc: خلايا كروية ترتبط ببعضها لتشكل خيوطاً بشكل السبحة، كما يوجد بين خلايا الخيوط خلايا الحويصلات المتباينة لتثبيت الآزوت الجوي،

وتكون المستعمرات محاطة بكمية غزيرة من الهلام (الشكلين ٧٥–٧٦).

الشكل 74 جنس *Gleocapsa*

الشكل 75 جنس *Nosto* كما يبدو تحت المجهر

الشكل 76 مستعمرات الـ *Nostoc*

١ – شعبة الطحالب الحمراء Rhodophycophyta :

تتميز بلونها الأحمر نظراً لغزارة صباغ اليحمور (الفيكوبيلين) في صانعاتها ينتشر معظمها في البحار. وهي تضم مجموعة من الطحالب كبيرة الحجم.

٢ – شعبة الطحالب النارية Pyrrophycophyta :

طحالب وحيدة الخلية سابحة غالباً، خلاياها عارية أو محاطة بدرع مؤلف من جزئيين علوي وسفلي، يفصلهما أخدود عرضي يتقاطع على الجبهة البطنية للخلية مع أخدود طولي خلفي. الخلايا النموذجية مجهزة بسوطين يتوضع أحدهما بالأخدود العرضي ويدور حول الخلية، بينما يتجه السوط الثاني نحو الخلف. الصانعات تحتوي على البيتاكاروتين والكزنتوفيل

واليخضور آ وج . ينتشر معظمها بالبحار، ولكن هناك أنواع عديدة توجد بالمياه العذبة. نذكر من أجناسها:

Peridinium: أفراد وحيدة الخلية ذات شكل بيضوي، الدرع السللوزي المحيط بها يبدي عادة زائدة علوية وزائدتين سفليتين تشبهان القرون (الشكل ٧٧).

الشكل 77 جنس *Peridinium*

Ceratium : أفراد وحيدة الخلية، يمكن تمييزها بسهولة بفضل الاستطالات والزوائد الطويلة التي يبديها الدرع (الشكل٧٨).

الشكل 78 نوعين من جنس*Ceratium*

٣- شعبة الطحالب الذهبية Chrysophycophyta :

معظم أنواعه وحيدة الخلية ساكنة أو متحركة. أو أنها تشكل مستعمرات صغيرة متكتلة أو خيطية. تبدي معظم الأنواع ظاهرة التمعدن بالكلس أو بالسليكات.

تنتشر بكثرة في العوالق البحرية وبدرجة أقل في المياه العذبة، ويعيش بعضها بشكل فوقي أو متثبت على القاع.

٤- شعبة المشطورات Bacillariophycophyta(Diatoms) :

طحالب وحيدة الخلية مجهرية تتميز بسهولة عن غيرها من الطحالب بدرعها السيليسي المؤلف من قطعتين، تشكل إحداهما المصراع العلوي الكبير المنطبق على المصراع السفلي الأصغر، وبالتالي فإن الخلية تشبه الصندوق أو طبق بتري، وبذلك تبدي وجهين: الأول مصراعي، والثاني حزامي أو جانبي. يتمعدن الدرع بالسيليكات، ويكون سميكاً بالأنواع القاعية ورقيقاً بالأنواع الطافية.

يمكن رؤية المشطورات من الوجه المصراعي أو الوجه الحزامي حسب درجة نمو كل منهما.

يمكن أن نميز مجموعتين من المشطورات:

رتبة المشطورات الريشية Pennales : يُبدي الدرع فيها مستويين للتناظر وأحياناً مستوى واحداً فقط، وتبدو النتوءات والفتحات متوزعة بشكل خطي على جانبي ثلم طولي متوسط على الوجه المصراعي، أو على جانبي خط متوسط في الأنواع عديمة الثلم الطولي. وهذه الأنواع واسعة الانتشار في المياه العذبة، حيث تشاهد بكثرة على القاع أو بشكل فوقي على الأحياء المائية. نذكر من أجناسها:

Synedra : خلايا طويلة ذات مصراع عديم الثلم الطولي، غالباً ما ترى من الوجه المصراعي (الشكل٧٩).

الشكل 79 جنس *Synedra*

Navicula : خلايا ذات ثلم طولي مستقيم ومدببة الطرفين (الشكل ٨٠).

الشكل 80 جنس *Navicula*

رتبة المشطورات المركزية Centrales : تتوزع فيها الفتحات والنتوءات بشكل شعاعي حول منطقة مركزية، وتبدي الخلية عادة عدداً كبيراً من مستويات التناظر، أو ينخفض فيها عدد مستويات التناظر إلى مستوى واحد، كثيراً من أنواعها تبدي نمواً كبيراً للوجه الحزامي، يمكن لبعضها أن تشكل مستعمرات صغيرة ، تكثر أنواعها في البحار والمحيطات نذكر من أجناسها:

Coscinodiscus : خلايا ذات وجه مصراعي مسطح عليه نقوش منتظمة ومتجانسة (الشكل ٨١).

الشكل 81 جنس *Coscinodiscus*

Chaetoceros : تشكل مستعمرات ذات خلايا مسطحة مزودة بزوجين من الزوائد الطويلة (الشكل٨٢).

الشكل 82 جنس *Chaetoceros*

٥ – شعبة الطحالب الصفراء المخضرة Xanthophycophyta:

طحالب ذات بنية بسيطة إما وحيدة الخلية أو تشكل مستعمرات صغيرة وأحياناً خيطية. تنتشر بشكل خاص في المياه العذبة والمستنقعات.

نذكر من أجناسها:

Vaucheria : مشرات خيطية أنبوبية متفرعة، ذات أعضاء تكاثر متميزة ومتمايزة إلى أكياس عروسية أنثوية بيضية تحوي بيضة واحدة، أما المناطف فهي أنبوبية معقوفة (الشكل ٨٣).

الشكل 83 جنس *Vaucheria*

٦- شعبة الطحالب السمراء Phaeophycophyta :

تعرف بلونها الأسمر بسبب احتوائها على نسبة عالية من أصبغة الفيكوكزانتين، وهي من الطحالب الكبيرة المنتشرة بشكل خاص في البحار.

٧- شعبة الطحالب الأوغلينية Euglenophycophyta :

طحالب سوطية وحيدة الخلية غالباً تحتوي على اليخضور آ و ب فهي بذلك تشبه الطحالب الخضراء لكنها لا تحتوي على النشاء (بعض أنواعها لا تحتوي أصبغة) تكثر في المياه العذبة والمياه الغنية بالفضلات العضوية.

نذكر من أجناسها:

Euglena : خلايا أسطوانية أو مغزلية طويلة مسوّطة (الشكل ٨٤).

الشكل 84 جنس *Euglena*

٨- شعبة الطحالب الخضراء Chlorophycophyta :

تركيبها الصباغي يشبه ما نلاحظه عند النباتات الراقية، فهي تحوي اليخضور آ و ب وأشباه الجزرينات وتدّخر النشاء. الصانعات فيها تبدي تنوعاً كبيراً في الشكل والحجم ولها أهمية تصنيفية.

تعيش بالدرجة الأولى في المياه العذبة ثم البحار، حيث تكون مثّبة على القاع أو تعيش بشكل فوقي على النباتات المائية والحيوانات كما تشكل قسماً كبيراً من العوالق المائية، وبعضها يعيش حياة شبه هوائية على السطوح الرطبة. ويمكن أن تتعايش مع الفطريات لتشكل الأشن.

نميز فيها ثلاثة صفوف هي:

صف الطحالب التزاوجية Zygophycetes :

أنواعه لا تبدي خلايا سابحة، تتكاثر عن طريق التزاوج (الأعراس متماثلة) وتنمو فقط في المياه العذبة. نذكر من أجناسها:

Spirogyra : مشرة خيطية غير متفرعة خلاياها تحوي صانعة أو عدة صانعات لولبية (الشكل ٨٥).

الشكل 85 جنس *Spirogyra*

Cosmarium : وحيد الخلية، خلاياه مسطحة قليلاً ومؤلفة من نصفين شبه كرويين، الصانع مقسم لأربعة فصوص (الشكل ٨٦).

الشكل 86 جنس *Cosmarium*

Closterium : خلاياها هلالية الشكل، الصانع هلالي ومؤلف من فصين (الشكل ٨٧).

الشكل 87 جنس *Closterium*

صف الطحالب الخضراء Chlorophycetes :

يضم هذا الصف الأشكال السوطية التي تشكل عند تكاثرها خلايا سابحة، الأنماط الشكلية متعددة وتصادف في المياه العذبة والبحار. نذكر من أجناسها:

Scendesmus : مستعمرة مؤلفة من (٢-٤ خلايا) وتحمل زوجين من الزوائد الشوكية، الصانعة شبكية (الشكل ٨٨).

الشكل 88 جنس *Scendesmus*

Pediastrum : مستعمرة مسطحة، خلاياها متعددة النوى، تنتظم في دائرة مسننة (الشكل ٨٩).

الشكل 89 جنس *Pediastrum*

٩ – شعبة الطحالب الكارية Charophycophyta:

من الطحالب الكبيرة، تنمو أجناسه في المياه العذبة.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

دليل أوساط الاستزراع
Guide of Media

أولاً: الأوساط الزرعية السائلة الجرثومية

- المرق المغذي Nutrient broth

المكونات:

5 غ	مستخلص اللحم
10 غ	ببتون (هضمون) Peptone
5 غ	ملح الطعام NaCl
1000مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تُمزج المكونات، وتُوزع في أنابيب بمعدل 5 مل لكل أنبوب وتعقّم بالمعقمة (الصاد الموصد) مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م.

في حال عدم توفر مستخلص اللحم يمكن تحضيره كالآتي:

نأخذ 1 كغ من اللحم البقري المفروم جيداً، ونضيف إليه 2 ليتر من الماء العادي. يغلى على النار مدة 20 دقيقة، ثم يترك ليبرد من 2 – 3 ساعات. تزال الطبقة الدهنية من على السطح ثم يرشح. تجمع الرشاحة في وعاء نظيف، ثم يضاف إلى كل 1000 مل من خلاصة اللحم 10 غ من الببتون و 5 غ من ملح الطعام. نضبط درجة pH على 7.6 ثم نعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م.

بعدها نعيد ضبط درجة pH على 7 – 7.2 ثم نوزع المرق في الأنابيب بمعدل 5 مل لكل أنبوب وتعقم ثانية على الدرجة 115°م مدة 25 دقيقة (**ملاحظة:** يجب أن تكون درجة التعقيم الثانية أقل ارتفاعاً من درجة التعقيم في المرة الأولى لكي نتجنب ترسب الفوسفات القلوية الترابية التي تعكر المحلول).

أما الببتون (الهضمون) فيحضر من تهضيم اللحم البقري بالببسين أو التربسين (فيسمى التربتون) أو بمواد أخرى. وقد يكون البروتين المستعمل من مصدر حيواني أو نباتي مثل لحم البقر أو نبات الصويا.

- **مرق الببتون الفيزيولوجي أو الماء الهضموني**

المكونات:

10 غ	ببتون
5 غ	NaCl
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7 – 7.2 ، يوزع في أنابيب ويعقم بالمعقمة (الصاد الموصد) عند الدرجة 121°م مدة 20 دقيقة.

هذا الوسط يُستعمل غالباً لدراسة تخمّر السكريات وإنتاج الاندول.

في حال استعماله لدراسة تخمّر السكريات نضيف إليه مشعراً لدرجة الحموضة pH مثل أزرق البروم تيمول أو أحمر الفينول، والسكر المراد دراسته بنسبة تتراوح

بين 0.5 – 5% . ويمكن تتكيس أنبوب Durham بداخل أنبوب المرق لمراقبة انطلاق الغاز، ثم يعقم.

- **مرق تريبتيكاز الصويا Trypticase (Tryptic) Soy**

المكونات :

17 غ	تريبتون Tryptone
3 غ	ببتون الصويا Soytone
2.5 غ	ديكستروز Dextrose
5 غ	كلوريد الصوديوم NaCl
2.5 غ	فوسفات ثنائية البوتاسيوم HK_2PO_4
1000 مل	ماء مقطر .

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7.3 ثم يوزع في أنابيب ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م.

- **مرق اللاكتوز Lactose broth**

المكونات:

3 غ	مستخلص اللحم
5 غ	ببتون Peptone
5 غ	لاكتوز
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتوزع في أنابيب وتعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م. إذا أردنا دراسة انطلاق الغاز ننكس أنبوبة دورهام Durham بداخل كل أنبوب قبل التعقيم ثم يعقم.

- **وسط التريبتون المغذي**

التركيب:

10 غ	تريبتون
10 غ	غلوكوز أو 5 غ ديكستروز
3 غ	مستخلص اللحم
5 غ	فوسفات أحادية البوتاسيوم H_2KPO_4
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير :

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7- 7.2 ، توزع في أنابيب وتعقم.

- **وسط السكريات ومشعر الحموضة**

B.C.P. Carbohydrate medium

المكونات:

5 غ	غلوكوز أو لاكتوز
10 غ	ببتون
5 غ	مستخلص الخميرة
2 غ	فوسفات أحادية البوتاسيوم

1000 مل	ماء مقطر
2 مل	مشعر بروم كريزول الأرجواني

طريقة التحضير:

تمزج المكونات، وتوزع في أنابيب وتعقم بالمعقمة (الصاد الموصد) عند الدرجة 121°م مدة 20 دقيقة.

يمكن إضافة 15 غ من مادة الآغار، فنحصل على وسط صلب.

ثانياً: الأوساط الآغارية (الصلبة) الجرثومية

- **الآغار المغذي Nutrient agar**

المكونات:

1000 مل	مرق مغذي
15 غ	آغار

طريقة التحضير:

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم يهيأ الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق معقمة.

- **الهلام المغذي Nutrient Gelatin**

المكونات:

1000 مل	مرق مغذي
120 غ	مسحوق الجيلاتين

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الهلام وتنحل تماماً، ثم يهيأ الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب، ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق معقمة.

- **آغار تريبتيكاز الصويا Trypticase (Trypti) Soy Agar**

يحضر مرق تريبتيكاز الصويا ويضاف إليه الآغار بنسبة 15 غ لكل 1000 مل.

- **آغار غلوكوز تريبتون Glucose Tryptone – Agar**

المكونات:

3 غ	مستخلص اللحم
5 غ	تريبتون
10 غ	غلوكوز
15 غ	آغار
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو

أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم يهيأ الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م، ثم يوزع في أطباق معقمة.

- **وسط الحليب الآغاري**

المكونات:

5 غ	مستخلص الخميرة
1غ	غلوكوز
20 مل	حليب منزوع القشدة ومعقم بالترشيح
15 غ	آغار
980 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ما عدا الحليب، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم يعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، ويترك ليبرد حتى الدرجة 45°م حيث يضاف إليه الحليب المعقم بشروط عقيمة ثم يوزع في أطباق معقمة.

- **وسط آغار إيوزين زرقة الميتلين**

Eosine Methylene blue agar

المكونات:

10 غ	ببتون
2 غ	فوسفات ثنائية البوتاسيوم HK_2PO_4

15 غ آغار

1000 مل ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم يوزع في دوارق بمقدار 100 مل لكل دورق ويعقم بالمعقمة مدة 30 دقيقة عند الدرجة 121°م، وعند الاستعمال تذاب الدوارق ويضاف إلى كل دورق (أي لكل 100 مل) الآتي:

5 غ لاكتوز

5 غ سكروز

0.4 غ ايوزين أو 2 مل من محلول الايوزين 2 %

0.1 غ أزرق الميتلين أو 1 – 2 مل من محلوله 0.2 %

تمزج المحتويات جيداً، وتسخن حتى درجة الغليان مدة 5 دقائق، ثم تبرد حتى الدرجة 50°م، وتوزع في أطباق معقمة.

- **وسط آغار ماكونكي Mac Conkey agar**

المكونات:

5 غ توركولات الصوديوم أو أي ملح صفراوي مناسب

20 غ ببتون

5 غ ملح الطعام NaCl

20 غ آغار

1000 مل ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، يضبط pH من 7.6 – 7.8 ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يضاف بياض البيض بنسبة بياض بيضة لكل ثلاثة ليترات من الوسط. يعقم مدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م، يرشح وهو ساخن ثم يضبط pH عند 7.3. يضاف 10 غ لاكتوز و 5 – 10 مل من محلول 1 % من الأحمر المعتدل، ويمزج جيداً، يوزع في دوارق، ويعقم ثانية مدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م، يترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق معقمة.

- **وسط النشاء الآغاري Starch agar**

المكونات:

1غ نشاء بطاطا قابل للانحلال

100 مل وسط الآغار المغذي المصهور

طريقة التحضير:

نحل 1 غ من نشاء البطاطا في 10 مل من الماء المقطر البارد ثم نمزجه مع 100 مل من الآغار المغذي المصهور، يعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق معقمة.

- وسط السيترات الآغاري (وسط سيمون) **Simmons agar**

المكونات:

0.2 غ	كبريتات المغنيزيوم
1 غ	فوسفات وحيدة الأمونيوم
1 غ	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
1غ	سيترات الصوديوم
5 غ	كلور الصوديوم
15 غ	آغار
0.08 غ	أزرق البروم تيمول
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، تضبط درجة pH على 6.8 ثم يهيأ الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق معقمة.

- وسط يحوي تحت خلات الرصاص للكشف عن انطلاق غاز H_2S

المكونات:

تحت خلات الرصاص

وسط الآغار المغذي المصهور

ماء مقطر

طريقة التحضير:

يحضر تحت خلالات الرصاص بنسبة 10/1 في الماء المقطر، ويضاف منه إلى لآغار المغذي المصهور بنسبة قطرتين لكل 5 مل من الآغار المغذي، ثم يوزع في أنابيب ويعقم.

- **وسط Salmonella – Shigella S.S**

المكونات:

5 غ	مستخلص لحم البقر
1 غ	سيترات الحديد
8.5 غ	تيو سلفات الصوديوم
8.5 غ	سيترات الصوديوم
5 غ	ببتون
10 غ	لاكتوز
8.5 غ	أملاح صفراوية
25 ملغ	الحمرة المعتدلة
0.33 ملغ	الأخضر اللامع
13.5 غ	آغار
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، يترك ليبرد حتى الدرجة 50 °م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة دون أن يعقم الوسط (أي الوسط ليس بحاجة إلى تعقيم).

- **وسط الأكسدة والتخمر**

Oxidation – Fermentation (O – F) medium

المكونات :

2 غ	ببتون أو تريبتون
5 غ	كلور الصوديوم
3 غ	فوسفات ثنائية البوتاسيوم
12.5 غ	آغار
3 مل	مشعر أزرق البرومتيمول (راجع دليل الصبغات والكواشف)
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات من دون أزرق البرومتيمول، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم تبرد حتى الدرجة 55 °م، ويضاف إليها البرومتيمول، تضبط درجة pH على 7.1، توزع في أنابيب، وتعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م. تترك الأنابيب لتتصلب بالوضع المائل.

يستعمل هذا الوسط للتفريق بين أنواع الجراثيم التي تؤكسد السكريات والأنواع التي تخمر السكريات حيث يضاف السكر المراد اختباره إلى الوسط ، ويلقح أنبوبان بالجراثيم المراد دراستها، على أن يغطى أحد الأنبوبين بطبقة من زيت البرفين المعقم لجعل الظروف لاهوائية، ويترك الأنبوب الآخر في ظروف هوائية. تحضن الأنابيب وتقرأ النتائج بانقلاب اللون.

- **وسط آغار المانيتول الملحي (شابمان) Mannitol salt agar**

المكونات:

1 غ	مستخلص اللحم
10 غ	ببتون
10 غ	مانيتول
75 غ	كلور الصوديوم
0.025 مل	أحمر الفينول Phenol red
15 غ	آغار
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أوأكثر حتى تتفتح حبات الأغار، وتنحل تماماً، تضبط درجة pH على 7.4، ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م. يستعمل هذا الوسط لعزل العنقوديات.

- وسط لاختبار الحركة **Motility test medium**

المكونات :

10 غ	تريبتوز Tryptose
5 غ	كلور الصوديوم
5 غ	آغار
1000 مل	ماء مقطر

طريقة التحضير:

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار، وتنحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.2 ويوزع في أنابيب، ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، ثم يترك ليتصلب بالوضع القائم.

ملاحظة: يمكن إضافة ملح النترازيليوم للوسط الذي يلوّن الخلايا باللون الأحمر؛ فتظهر الحركة أكثر وضوحاً.

ثالثاً: الأوساط الصلبة الفطرية

- وسط شابيك **Czapek medium**

٣ غ	$NaNO_3$
١ غ	K_2HPO_4

٠.٥ غ	$MgSO_4 . 7H_2O$
٠.٥ غ	KCl
٣٠ غ	سكروز
١٠٠٠مل	ماء مقطر
٢٠ غ	آغار آغار

تحل المكونات بالماء ثم يعقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

- **وسط البطاطا السكرية Potato dextrose agar (PDA) medium**

٢٠٠غ	قطع بطاطا مقشرة
١٠ غ	غلوكوز
١ ليتر	ماء عادي
١٥ غ	آغار آغار

تحل المكونات بالماء ثم يعقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

- **وسط خلاصة الشعير Malt extract medium :**

٢٠ غ	خلاصة الشعير
٢٠غ	غليكوز
١ غ	ببتون
١ ليتر	ماء عادي

٢٠ غ آغار آغار

تحل المكونات بالماء ثم يعقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

رابعاً: أوساط استزراع الطحالب

- **وسط عام للدراسة الروتينية**

٢٠٠ملغ KNO_3

٤٠ ملغ K_2HPO_4

٣٠ ملغ $MgSO_4$

٣٠ غ $NaNO_3$

١٠٠٠ مل ماء مقطر

تُحلُّ الأملاح السابقة بالماء المقطر ويضاف إليها بضع قطرات من محلول عناصر الندرة، كما يفضل أن يضاف إليه ١٠ مل من مستخلص التربة، يُعقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

- **وسط خاص لتنمية الطحالب الخضراء**

٨٠٩ ملغ KNO_3

468 ملغ $NaCl$

178 ملغ Na_2HPO_4

٤٦٨ ملغ $NaH_2PO_4.2H_2O$

٢٢ ملغ	$CaCl_2$
247 غ	$MgSO_4 . 7H_2O$
٢٠ ملغ	$FeSO_4 . 7H_2O$
٠.٢ ملغ	$MnCl_2 . 2H_2O$
٠.١ملغ	$ZnSO_4 . 7H_2O$
١٠٠٠ مل	ماء مقطر

تُحلّ المكونات بالماء ثم يعقم بجهاز التعقيم بالحرارة الرطبة بدرجة ١٢١°م مدة ١٥ دقيقة.

Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

محاليل صبغة غرام Gram staining

أ – صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet

1غ بلورات بنفسجية بنقاوة 90% من الصبغة

100 مل من الماء المقطر

تذاب الصبغة ثم ترشح.

طريقة أخرى

2 غ بلورات بنفسجية

20 مل كحول ايتيلي 95%

80 مل من محلول أوكزالات الأمونيوم 1%

تذاب ثم ترشح.

طريقة ثالثة

1 غ بلورات بنفسجية

10 مل كحول 100%

1 غ حمض فيني

100مل ماء مقطر

تُحلُّ البلورات البنفسجية في الكحول، ثم يضاف الحمض الفيني بالتدريج حتى تمام الانحلال ثم يضاف الماء المقطر ببطء. يترك المزيج 24 ساعة ثم يرشح.

ب – محلول لوغول أو صبغة غرام اليودية Iodine solution

1 غ يود

2 غ يود البوتاسيوم

300 مل ماء مقطر

يسحق اليود ويود البوتاسيوم في هاون، ثم يذاب المسحوق بالماء ويرشح. يحفظ في زجاجة بنية اللون، لأنه يحمض بالضوء فلا يعود صالحاً للتلوين، وتعدل الحموضة حين حصولها بإضافة قليل من ثنائي كربونات الصوديوم.

ج – محلول السفرانين Safranine

0.25 غ سفرانين نقاوة 90%

10 مل كحول ايتيلي 95%

1000 مل ماء مقطر

يذاب السفرانين في الكحول ثم يضاف 10 مل ماء مقطر ويرشح المزيج.

صبغة أزرق الميتلين Methylene blue

3 غ أزرق المتلين

30 مل كحول 95%

100 مل ماء مقطر

يذاب أزرق الميتلين بالكحول، ثم يضاف إليه الماء، ويرشح.

صبغة الهيماتوكسيلين لتلوين الطحالب Hematoxyline

٠.٥ غ هيماتوكسيلين

٠.٢٩ غ بيكربونات الصوديوم

١٠٠ مل ماء مقطر

يُذاب الملون بالماء المقطر المسخن لدرجة الغليان، ثم تضاف كمية البيكربونات، ويبرد، ويرشح.

مشعر أزرق بروم تيمول

يحل 0.4 غ من أزرق البروم تيمول في 500 مل من الكحول الإتيلي 95% ثم يضاف إليه 500 مل من الماء المقطر، ثم نرشح المزيج.

مشعر الفينول فتالين

يُحلُّ 1 غ من الفينول فتالين في 50 مل من الكحول الإتيلي 95% ثم يضاف 50 مل من الماء المقطر.

كاشف إرلخ – كوفاكس Ehrlich – Kovacs

هو بارا دي مثيل أمينو بنز ألدهيد Paradimethylaminobenzaldehyde يحضر بمزج 5 غ بارا دي مثيل أمينو بنز ألدهيد مع 75 مل من الغول الأميلي Alcohol amylique على البارد ثم يضاف 25 مل من حمض كلور الماء النقي.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

المصطلحات Terms

A

Actinobacteria	الجراثيم الشعاعية، الشُعيّات
Actinomycetes	الأكتينوميستات، الشعيات
Aerobicbacteria	الجراثيم الهوائية
Agar	الأغار
Agarslope	الأغار المائل
Agglutination	التراص
Algae	الطحالب
Amylas	أنزيم الاميلاز
Anaerobicbacteria	الجراثيم اللاهوائية
Antibiotic	صاد حيوي
Antibodies	الأجسام المضادة
Antigens	مولدات الضد
Ascomycota	تحت شعبة الفطريات الزقية
Autoclave	المعقمة،الأوتوغلاف (الصاد الموصد)

B

Bacillus	عُصية
Bacteria	جراثيم
Bacterial	جرثومي
Bacterial Counter	عدادة جرثومية
Bacterialmutation	طفرة جرثومية
Basidymycota	تحت شعبة الفطريات الدعامية
Biological	حيوي
Biology	علم الأحياء (بيولوجيا)
Blue Bromothymol	زرقة البروموتيمول
Broth	مرق
Buffer	المحاليل الموقية
Buffer solutions	مواد واقية (منظمة)
Bunsen burner	موقد بنزن

C

Capsule	المحفظة

Cell	خلية
Cntrales	المشطورات المركزية
Centrifuge	جهاز الطرد المركزي
Charbohydrates	سكريات
Charophycetes	صف الطحالب الكارية
Chlamydiaceae	المتدثرات
Chlamydospores	أبواغ مغطاة
Chlorophycetes	صف الطحالب الخضراء
Chlorophycophyta	شعبة الطحالب الخضراء
Chrysophycetes	صف الطحالب الذهبية
Chrysophycophyta	شعبة الطحالب الذهبية
Citric acid	حمض الليمون
Cocci	المكورات
Coccobacilli	عصيات مكورة
Coliforms	أشكال معوية أو قولونية
Colony	مستعمرة
Compound Microscope	المجهر المركب

Culture Media	أوساط الاستنبات
Cyanobacteria	الجراثيم الزرقاء

D

Dark-Field Microscope	مجهر الحقل المظلم
Deuteromycotina -Fungi imperfecti	تحت شعبة الفطريات الناقصة
Diatomophycetes	صف المشطورات
Diplococci	مكورات دقيقة
Disinfectants	المطهرات
Disinfection	التطهير
Dry heat	الحرارة الجافة

E

Electron Microscopes	المجاهر الالكترونية
Electronic Radiations	الأشعة الالكترونية
Endospores	الأبواغ الداخلية
Enterobacteriaceae	فصيلة الامعائيات
Euglenophycophyta	شعبة الطحالب الأوغلينية
Eumycota	شعبة الفطريات الحقيقية

Damascus University

F

Facultatively anaerobic bacteria	الجراثيم اللاهوائية اختيارياً
Filtration	ترشيح
Fimbriae	أهداب
Fixation	عملية التثبيت
Flagella	السياط
Fluorescence	الفلورة، التألق
Fluorescence Microscope	المجهر الفلورسيني – التألقي
Fungi – Mycota	الفطريات

G

Gelatinase	إنزيم الجيلاتينات
Gelatinous	هلامي
Gene	المورثة، الجيني
Glycoproteines	بروتينات سكرية
Gram – negative	سلبي لصبغة الغرام

Gram staining	صبغة غرام
Growth factors	عوامل النمو

H

Hypha	الخيط الفطري

I

In – vivo	في الأحياء
In –Vitro	في الزجاج
Incubator	حاضنة

L

Isotope	نظير مشع
Lactic acid	حمض اللبن
Laminar flow	غرفة الزرع الجرثومي (اللامنير)
Lichens	الأشن
Light	ضوء
Light Microscope	المجاهر الضوئية

جامعة دمشق Damascus University

Lipids	شحوم، دهون
Lipoproteins	بروتينات شحمية- دهنية
Lysis	تحلل الخلايا

M

Mastigomycota	تحت شعبة الفطريات السوطية
Media	أوساط
Medical	طبي
Medical microbiology	ميكرو بيولوجيا طبية
Membrane	غشاء
Metabolism	استقلاب
Micro balance	ميزان حساس
Microaerophilic bacteria	الجراثيم أليفة قلة الأكسجين
Microbes	أحياء دقيقة
Microbial	الميكروبات / ميكروبي
Microbiological Safety cabinet	غرفة العزل الميكروبي الأمنة

Microbiology	علم الأحياء الدقيقة، الميكروبيولوجيا
Micrococci	مكورات دقيقة
Microflora	النبيت الطبيعي
Microscope	مجهر
Milliporfilter	أغشية ترشيح دقيقة
Mycelium	مشيجة، أفطورة
Mycoplasma	المفطورات
Mycorrhizae	الفطريات الجذرية
Myxomycota	شعبة الفطريات المخاطية

N

Natural Media	أوساط طبيعية
Negative staining	التلوين السلبي
Nutrient	مغذ

O

Obligate thermophytes	أليف للحرارة إجبارياً
Organic	عضوي

Damascus University

Organism	حي، كائن حي، عضوية
Ovens	أفران الهواء الساخن
Oxidation	أكسدة

P

Pasteurization	البسترة
Pennales	المشطورات الريشية
Peritrichous	محيطي السياط
pH	دالة الهدروجين
PH Meter	مقياس الرقم الهيدروجيني
Phase Contrast Microscope	مجهر الأطوار المتباينة
Pheophycophyta	صف الطحالب السمراء
Pili	أهداب
Pipette Pasteur	ممص باستور
Plectechyma	الأنسجة المحبوكة
Polypeptides	عديد الببتيد
Polysaccharides	عديدات السكر

Proteolysis	تحلل بروتيني
Psychrophilic	جراثيم محبة للبرودة
Pure	نقي
Pyrrophycophyta	شعبة الطحالب الذارية

R

Resistance	مقاومة
Rhizosphere	محيط جذري
Rhodophycophyta	شعبة الطحالب الحمراء
Rickettsiaceae	الركتسيات
Rods (Bacillus)	عصيات

S

Salmonella	سلمونيلة
Sarcina	رزمية
Scanning Electron Microscope	المجهر الالكتروني الكانس أو الماسح
Shaker	جهاز الرج
Shigella	شيغلّة

Simple Microscope	المجهر البسيط
Simple staining	التلوين البسيط
Smear	اللطخة الجرثومية
Soil	التربة
Solution	المحلول
Spectrophotometer	مقياس الطيف الضوئي
Spirals	الملويات /اللولبيات/ حلزوني
staining	التلوين المركب
Staphylococci	مكورات عنقودية
Starch agar	آغار النشاء
Sterilization	التعقيم
Strain	سلالة
Streptobacilli	عصيات عقدية
Streptococci	مكورات عقدية
Sugars	سكريات
Sulphate	كبريتات

Synthetic Media	أوساط صنعية

T

Tartaric acid	حمض العنب
Temperature	درجة الحرارة
Tetracocci	مكورات رباعية
Thermal	حراري
Thermoduric e	جراثيم متحملة للحرارة
Thermophilic	جراثيم أليفة للحرارة
Theromphile	أليف للحرارة
Transmission Electron Microscope	المجهر الإلكتروني الناقل
Treponema	اللولبيات
Typhoid	التيفية

U

Ultra Violet	الأشعة فوق البنفسجية
Ultrasonic	فوق الصوتية

Ultraviolet	فوق البنفسجية
Ultra Violet Light Microscope	مجهر الأشعة فوق البنفسجية

V

Vialids	زوائد قارورية
Vibrio	الضمات
Viruses	الفيروسات
Vitamins	فيتامينات

W

Water -bath	حمام مائي
Water heat	التعقيم بالحرارة الرطبة

X

Xanthophycetes	صف الطحالب الصفراء المخضرة

Y

Yeasts	خمائر

Z

Zygomycota	تحت شعبة الفطريات الازدواجية
Zygophycetes	صف الطحالب التزاوجية
Zygospore	الأبواغ الازدواجية الملقحة
Zygote	بيضة ملقحة
Zygote	بيضة ملقحة

Damascus University

المصادر والمراجع العربية

١- الأشقر، كمال (٢٠٠٩)الفطريات الجزء النظري، منشورات جامعة دمشق.

٢- السلامة، علي عبد الله – علي، زيد – علي، محمد، (٢٠٠٢) التجارب العلمية في البكتريا الطبية، منشورات جامعة الملك سعود.

٣- بغدادي، وفاء- ميهوب، حامد- حمد، ابتسام (١٩٨٨) بيولوجيا المشريات، جامعة دمشق.

٤- حمد ، ابتسام – بكور الزيات ، ميساء – سوسان ، عماد (٢٠١٠) علم الجراثيم الجزء العملي ، منشورات جامعة دمشق.

٥- حمد، ابتسام، (٢٠٠٦) علم الجراثيم العام، كلية العلوم، منشورات جامعة دمشق.

٦- حمد، ابتسام – الأشقر، كمال (٢٠١٠) علم الحياة النباتية (٢) التكاثر في الزمر النباتية الجزء النظري ، منشورات جامعة دمشق.

٧- عبيد، ميخائيل، (١٩٩٧) علم الجراثيم الجزء النظري، منشورات جامعة دمشق.

٨- عبيد، ميخائيل، (٢٠٠٠) علم الجراثيم الجزء العملي، منشورات جامعة دمشق.

٩- علي نظام، عدنان- الأشقر، كمال (٢٠٠٨) بيولوجيا الأحياء الدقيقة الجزء النظري، منشورات جامعة دمشق.

١٠- مرعي، عبد الوهاب – بكور الزيات، ميساء (٢٠٠٦) ميكروبيولوجيا الأغذية، الجزء العملي، منشورات جامعة دمشق.

المصادر والمراجع الأجنبية

1-Abigail, A.S, Dixie. D.W. (2001), Microbiology Diversity, Disease, and the Environment Fitzgerald Scienc Press Publisher.

2-Baron, E.J, Peterson, L.R, Fine Gold, S.M, (1994). Diagnostic Microbiology. Vinth Edition Copyright by Mosby – Yeav Book, Inc Publishers.

3- Betsy, T.D.C, Keoyh, J. (2005). Micorbiology Demystified. McGraw- Hill. U.S.A. ISBN: 0-07 147134-0.

4- Burton, G.R.W, Engelkirk, P.G (2002). Micorbiology for the Health Sciences.7th . Ed. Lippincott Williams and Wilkins co. U.S.A.

5- Forbes,B.A, SA hm, D.F, Weissfeld, A.S. (2002). Bailey and Scott s Diagnostic Micorbiology. 11th edition. Mosby, Inc. Philadelphia, PA, USA.

6-Harry W.Seeley,Jr, Paulj, Vandemark (1989), Microbes in Action, Alaboratory Manual of Microbiology, thix Edition, Cornell university Publisher.

7-Harley, J.P,(2005) Laboratory Exetcises In Microbiology, Sixth Edition, Kentucky University, the Mc Graw- Hill Higher Education Publisher.

8- Lerner, K.L, Lerner, B.W. (2003) world of Micorbiology and Immunology. Vol. 1. Thomson Gale Group, Inc. U.S.A. ISBN: 0-7876-6541-1.

9-Prescott, L.M, Harley, J.P, Klein, D.A, (1996) Microbiology, Threeth Edition, W.M.C.Brown Publishers, Turnhout, Canada.

10- Prescott, L.M. (2002). Micorbiology.5th . Ed. McGraw-Hill. U.S.A. ISBN: 0-07- 282905-2.

11-Prescott, Harley and Klein s , (2008), Microbiology Seveth Edition, the Mc Graw- Hill companies Publisher.

12- Talaro, K.P, Talaro, A. (2002). Foundation in Micorbiology.4th .ed. McGraw- Hill. U.S.A. ISBN: 0-07-248864-6.

اللجنة العلمية:

- الأستاذ الدكتور عدنان علي نظام
- الدكتور محمد بشير عرنوس
- الدكتورة غيثاء منصور

المدقق اللغوي:

الدكتورة منيرة محمد فاعور

حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات الجامعية

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University