

علم الجراثيم العام
الجزء العملي



السنة: الثالثة

القسم: علم الحياة النباتية

الفرع: الأحياء الدقيقة



منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

علم الجراثيم

الجزء العملي

الدكتورة

ابتسام حمد

أستاذة في قسم علم الحياة النباتية

عماد سوسان

قائم بالأعمال في قسم علم الحياة
النباتية

ميساء بكور الزيات

مشرفة على الأعمال في قسم علم
الحياة النباتية

1431 - 1432 هـ

جامعة دمشق

2010 - 2011 م



الموضوع	الصفحة
المقدمة	11
الفصل الأول: مدخل إلى علم الجرائم	13
- الصفات العامة للجرائم	13
- تعريف الجرائم	13
- أبعاد الجرائم	14
- أشكال الجرائم	14
توجيهات وإرشادات عامة	17
- مواصفات المختبر الجرثومي	17
الملاحظات والتوصيات الواجب اتباعها في المختبر الجرثومي	20
- تنظيف الأدوات الزجاجية	24
الفصل الثاني: الأدوات والتجهيزات الخاصة بالمختبرات الجرثومية	27
الأدوات المستعملة في المختبر الجرثومي	27
الأجهزة المستخدمة في المختبر الجرثومي	29
الفصل الثالث: المجاهر	41
- المجاهر الضوئية	41
1 - المجهر البسيط	43
2 - المجهر المركب	43
3 - مجهر الأشعة فوق البنفسجية	45
الموضوع	الصفحة

46	4- المجهر الفلوري سني
46	5 - مجهر الحقل المظلم
48	6 - مجهر الأطوار المتباينة
50	- المجاهر الإلكترونية
53	1- المجهر الإلكتروني الناقل
56	2- المجهر الإلكتروني الكانس أو الماسح
58	- التقنيات الحديثة في الفحص المجهرى
58	1 - الفحص المجهرى متحد البؤر (المباتر)
62	2 - الفحص المجهرى بالمسبار الماسح
67	الفصل الرابع: التعقيم
67	- تعريف التعقيم
68	- آلية التعقيم
68	- ضبط عملية التعقيم
69	- طرائق التعقيم
70	أولاً : التعقيم بالحرارة
78	ثانياً : التعقيم بالأشعة
79	ثالثاً : التعقيم بالترشيح
82	رابعاً : التعقيم بالغازات وأبخرتها
84	خامساً : التعقيم الكيميائي

85	الفصل الخامس: المطهرات
85	- تعريفها
85	- آلية تأثيرها
86	- أنواع المطهرات
95	الفصل السادس: أوساط الاستنبات
95	- تعريف أوساط الاستنبات
97	- الشروط الواجب توافرها في الأوساط الغذائية
99	- أنواع أوساط الاستنبات
101	الفصل السابع: تقانة الزراعة الطاهرة وطرائق الاستنبات
102	- المحاذير التي يجب ملاحظتها عند أخذ النماذج الجرثومية وزرعها
103	- طرائق تحضير المزارع الجرثومية
104	- طرائق الاستنبات
104	أولاً : الاستنبات في أنابيب
107	ثانياً : الاستنبات في أطباق بتري
112	- صفات المزارع ونوع النمو
118	- عزل المزارع الجرثومية وحفظها
119	- طرائق حفظ المزارع الجرثومية
123	الفصل الثامن: استنبات الجراثيم اللاهوائية المجبرة
123	- الخطة المتبعة في دراسة الجراثيم اللاهوائية
123	- الوسائط المستخدمة لنزع الأوكسجين من أوساط الاستنبات
124	- الطرائق المستخدمة في زرع الجراثيم اللاهوائية

129	- دراسة أشكال المستعمرات النامية بالزرع اللاهوائي
131	الفصل التاسع: الفحص المجهرى للجراثيم
132	أولاً- الفحص المباشر
136	ثانياً- الفحص بعد التثبيت والتلوين
137	- طببعة الملونات
138	- تحضير النموذج للتلوين
141	- طرائق التلوين
141	- التلوين البسيط
143	- التلوين السلبي
145	- التلوين المركب
169	الفصل العاشر: دراسة بعض خواص الجراثيم وتحديد نوعيتها
170	1 - انتشار الأحياء الدقيقة
173	2 - تحديد حاجة الجراثيم لأوكسجين الهواء
176	3 - تأثير درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم
181	4 - تأثير درجة pH في نمو الجراثيم
182	5 - تأثير المواد المضادة للجراثيم
187	6 - دراسة الخصائص الحيوية الكيميائية للجراثيم
187	أولاً : اختبارات استقلاب السكريات
187	أ - اختبار تخمر السكريات بوساطة الجراثيم
190	ب - اختبار أحمر الميتيل - فوكس بروسكاوير
194	ج - اختبار هاجنا - كليفلر
196	د - اختبار تحلل النشاء
الصفحة	الموضوع
199	هـ - اختبار ONPG

201	ثانياً : اختبارات تحلل البروتين
201	أ - إمالة الجيلاتين
204	ب - إمالة الكازئين
207	ج - اختبار إنتاج الإندول
209	د - اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين
211	هـ - نزع الأمين من الحموض الأمينية
214	و - نزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية
218	ز - الكشف عن الجراثيم المحللة للدم
220	ح - اختبار إنزيم المخثرات Coagulase
223	ثالثاً : اختبارات أخرى
223	أ - دراسة إمكانية النمو على وسط لا يحتوي إلا على فحم معدني (وسط سيمون Simone)
225	ب - إمالة البولة
227	ج - اختبار نشاط إنزيم الكاتالاز
229	د - اختبار نشاط إنزيم السيتوكروم أوكسيداز
231	هـ - اختبار إرجاع النترات
234	و - اختبار DNase
237	الفصل الحادي عشر: تعريف الجراثيم المعوية باستخدام نظام API ₂₀ E
237	- الهدف من التجربة
237	- الأساس العلمي
الصفحة	الموضوع
238	- مجموعة الكواشف وتركيبها

240	- إعداد شريط API ₂₀ E
240	- إعداد المعلق الجرثومي
241	- تلقیح شريط API ₂₀ E
241	- قراءة النتائج
244	- التعريف (تحديد هوية الجرثوم)
245	- التخلص من الأدوات بعد الانتهاء من العمل
245	- ضبط الجودة
247	الفصل الثاني عشر: التغيرات والطفرات والتأشيب عند الجراثيم
248	أولاً : دراسة التغيرات الجرثومية
249	ثانياً : دراسة الحث الإنزيمي عند الجراثيم
253	ثالثاً : الطفرة الجرثومية
256	رابعاً : التحويل الجرثومي
262	خامساً : الاقتران الجرثومي
268	سادساً : استخلاص DNA من خميرة البيرة (الخبز)
271	سابعاً : استخلاص DNA من العصية المعوية وتنقيته
277	دليل الأوساط
305	دليل الصبغات والكواشف
313	المصطلحات
325	المراجع والمصادر

مقدمة

تتناول مواضيع هذا الكتاب مفردات منهج (عملي مقرر علم الجراثيم العام لطلاب السنة الثالثة- شعبة الأحياء الدقيقة بقسم علم الحياة النباتية) من كلية العلوم في جامعة دمشق، ويهدف بالدرجة الأولى إلى التعريف بأحد فروع علم الأحياء الدقيقة (الجراثيم Bacteria) من الناحية العملية لتتم ما جاء في الجزء النظري من هذا المقرر الذي يُعدّ من المقررات الحيوية المهمة والأساسية لدراسة عدد من المسائل المتعلقة بحياة الإنسان والحيوان والنبات. وبخاصة بعد أن تبين ما للجراثيم من أوجه نافعة من الناحية الصحية والصناعية والزراعية تفوق كثيراً أوجه ضررها.

لقد راعينا في هذا الكتاب السلاسة والتبسيط في عرض معظم المواضيع المتعلقة بعملية الجراثيم، وبما يناسب الزمن المخصص لتدريس هذا المقرر. حيث بدأ باستعراض الصفات العامة للجراثيم ومواصفاتها المختبر الجرثومي والملاحظات والتوصيات الواجب إتباعها فيه.

ثم استعرضنا الأدوات والتجهيزات الخاصة بالمختبرات الجرثومية والمجاهر وتقانات الفحص المجهرى وسُبل التعقيم وأوساط الاستنبات وطرقه.

ثم جاءت دراسة بعض خصائص الجراثيم وتحديد نوعيتها، وجُعِلَ فصلٌ لتحديد الجراثيم المعوية باستخدام نظام API20E، كما أُفرد فصلٌ خاصٌ بالوراثة لاستعراض التغيرات والطفرات والتأشيب عند الجراثيم. كما أُلْحِقَ دليلٌ للأوساط والصبغات والكواشف وفهرس بالمصطلحات العلمية الواردة في هذا الكتاب.

إن منتهى ما نرجوه أخيراً أن نكون قد وفقنا 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 2010 م

المؤلفون

الفصل الأول

مدخل إلى علم الجراثيم

الصفات العامة للجراثيم

1 - تعريف الجراثيم :

هي كائنات حية صغيرة الحجم تنتشر انتشاراً واسعاً في الطبيعة ، تعيش في المياه والتربة والهواء وفي الفجوات الطبيعية للإنسان والحيوان وعلى الجلد ، تتصف بما يلي :

- وحيدة الخلية .
- قد تكون متحركة أو عديمة الحركة .
- تحتوي على مادة نووية مكونة من صبغي وحيد غير محاط بغلاف (غشاء) نووي .
- تتكاثر بالانقسام المباشر وبعضها يتكاثر جنسياً، يمكن لبعضها أن يشكل الأبواغ الداخلية Endospores .
- لا تحتوي الكيتين Chitin ولا السلولوز Cellulose وإنما هناك بديل عنها حمض التيكويك Teichoic acid .
- تعيش إما بوجود أوكسجين الهواء فتسمى هوائية Aerobic bacteria أو لا تستطيع العيش بوجود أوكسجين الهواء فتسمى جراثيم لاهوائية Anaerobic bacteria أو تستطيع العيش بوجود أوكسجين الهواء أو عدم وجوده فتسمى الجراثيم اللاهوائية المخيرة Facultatively anaerobic bacteria ، وهناك بعض الجراثيم تعيش بوجود كميات قليلة من الأوكسجين وتتأثر بالكميات

الكبيرة منه، تسمى بالجراثيم المحبة لآثار من الأوكسجين

.Microaerophilic bacteria

أبعاد الجراثيم :

تختلف أبعاد الخلايا الجرثومية بحسب النوع، و معظم الجراثيم الممرضة للإنسان هي بقطر يتراوح بين 0.5 - 1 ميكرون، وعندما تكون الخلايا الجرثومية عصوية لا يتجاوز طولها بضعة ميكرونات، أما بالنسبة لبعض الملتويات فيمكن أن يصل طولها حتى 50 ميكرون، وقد يقصر طول بعض الجراثيم إلى 0.2 ميكرون في حال بعض الركستيات .

أشكال الجراثيم :

للجراثيم أربعة أشكال رئيسة (الشكل 1) هي :

1- المكورات **Cocci** : وهي ذات شكل كروي ، تضم جراثيم غير متحركة وغير متبوعة¹، قطرها غالباً أقل من 1 ميكرون، تصنف تبعاً لتوضع خلاياها بعد الانقسام (حسب اصطفاها أي حسب نظام تجمعها) وفق ما يلي:

- منفردة وتدعى Micrococci .

- مزدوجة وتدعى Diplococci ، وقد تكون ذات شكل بيضوي ومثالها المكورات السحائية، والمكورات البنية التي لها شكل حبة البن. أو تكون ذات شكل مدبب كالمكورات الرؤوية.

- رباعية وتدعى Tetracocci أو Tetragens وتتألف من أربعة خلايا.

* هناك جنس وحيد متبوع يتبع إلى الجراثيم المكورة هو Sporsarcinac .

- رزمية حيث تتجمع الخلايا لتشكل كتلة مكعبية الشكل، وتدعى
. Sarcinae

- سبحية الشكل وتدعى المكورات العقدية Streptococci وقد تكون

عبارة عن مكورات عقدية مزدوجة وتدعى Streptodiplococci .

- عنقودية التجمع وتدعى المكورات العنقودية Staphylococci .

2 - العصيات Bacilli أو Rods : وهي ذات شكل أسطواني عصوي،

وتتميز باختلاف أحجامها وتعدد أشكالها وأنماط توزيعها بعد الانقسام، ويمكن
تمييز الأشكال الآتية :

- عصيات ذات نهاية محدبة أو مستديرة مثل العصيات القولونية .

- عصيات ذات نهاية مقطوعة أو مبتورة مثل عصيات الجمرة .

- وتدية الشكل مثال الوتديات الخناقية .

- مغزلية الشكل كالعصيات المغزلية .

- عصيات منحنية بشكل الضمة مثال ضمّات الهبضة (الكوليرا) .

- عصيات مكورة Coccobacilli وهي عصيات قصيرة .

أما تجمع العصيات فيكون بالأشكال الآتية :

- منفردة Bacilli مثل العصية التيفية .

- مزدوجة Diplobacilli مثل الكليبسلة الرئوية .

- عقدية بشكل السبحة (سلسلية) Streptobacilli مثل عصيات

الجمرة.

- مجتمعة بشكل أحرف صينية مثل الوتدية الخناقية .

- مجتمعة بشكل حزمة مثل عصيات الجذام .

- مجتمعة بشكل ريشي مثل عصيات السل .

الشكل	الترتيب
كروي	المكورات المزدوجة
مكورات	المكورات العقدية
	المكورات العنقودية
	المكورات الرباعية
عصوي	العصيات السلسلية (العقدية)
عصيات	
لولبي	المكورات الترزمية
حلزونية	
حلزون غير كامل	الضمائم
شكل غير منتظم	عصوي غير منتظم

الشكل 1

بعض أشكال الخلايا الجرثومية

3 - الملتويات Spirals : تبدو كالحيط الملتوي أو كالنابض الحلزوني، 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 .
- الملويات *Spirochaete* .

4 - الجراثيم الشعاعية *Actinobacteria* : وهي جراثيم خيطية توجد في صورة خيوط متفرعة بأنماط عديدة حتى في الجنس الواحد ، كان يطلق عليها اسم الفطريات الشعاعية *Actinomycetes* وكانت تصنف مع الفطريات.

إن هذه الأشكال السابقة ليست ثابتة ويمكن أن تتغير: بحسب وجود الجراثيم في العضوية الحية أو في المستنبتات الزرعية وبحسب تركيب هذه المستنبتات .

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

توجيهات وإرشادات عامة :

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

مواصفات المختبر الجرثومي :

وضعت مواصفات دولية للمختبر الجرثومي كي يكون أكثر راحة وأماناً، ولإقلال - قدر الإمكان - من التلوث ومخاطره .

وعليه فقد قُسم المختبر الجرثومي إلى ثلاثة أقسام هي :

القسم الأول: لتجهيز أوساط الاستنبات، وجميع المواد الكيميائية الأخرى اللازمة للاختبارات مع تجهيز كافة لوازم التجارب العملية وأدواتها. القسم الثاني: للقيام بعملية الزراعة الطاهرة وإجراء الاختبارات والحضن . القسم الثالث: لتلف النفايات الجرثومية والتخلص منها بشكل سليم، وتنظيف الأدوات الزجاجية .

يبدأ تجهيز المختبر الجرثومي عند تصميم بنائه، فهناك شروط يجب إتباعها في أثناء بناء المختبرات الجرثومية، فهي تختلف عن باقي المخابر بعدة نواحٍ نذكر منها :

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

- يجهز المختبر الجرثومي ببابين يفصل بينهما ممر طويل نوعاً ما، هذان البابان لا يفتحان معاً، وإنما يفتح الباب الأول ليدخل منه العاملون في المختبر إلى الممر، ثم يغلق هذا الباب ليستقر الهواء قليلاً في الممر، عندها يمكن فتح الباب الثاني . وذلك كي لا تتشكل تيارات هوائية قوية وسريعة من شأنها أن تدخل الهواء من خارج إلى داخل المختبر أو العكس .

- يمكن أن يوضع عند الباب الأول ستائر هوائية لمنع دخول الحشرات إلى داخل المخبر .

- توضع عادةً المعاطف البيضاء 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 تشكل الزوايا بين الجدران والسقف والأرض على شكل دائري أملس مستمر، لأن تنظيف الزوايا وتعقيمها صعباً 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 والأس والحرارة مثل مادة الإيبوكسي. أما بالنسبة لمصارف المياه في المختبر ، فيجب أن تبطن جميع مصارف المياه 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 تتعشق الغبار المليء بالجراثيم .

- يجب أن تكون صنادير المياه من النوع الذي يفتح آلياً عند وضع اليدين تحته ولا يفضل إطلاقاً استخدام صنادير المياه العادية التي تفتح بقبضة اليد، كي لا تكون سبباً لانتقال الجراثيم من شخص لآخر .

- وكذلك الأمر بالنسبة للأبواب، يجب أن تفتح كهربائياً وليس بقبضة يدوية.

الملاحظات والتوصيات الواجب إتباعها في المخبر الجرثومي :

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

هناك بعض الملاحظات والتوصيات التي يجب مراعاتها وإتباعها في مختبر الجراثيم :

- 1 - ارتداء المعطف الأبيض قبل البدء بالعمل . ويجب تعقيمه فوراً في حال تلوثه بالجراثيم ، كما يجب عدم إخراجه من المختبر إلا في نهاية الفصل وبعد تعقيمه (إن أمكن ذلك) .
- 2- تغطية شعر الرأس مع الأنف والفم بقناع قماشي، وارتداء القفازات.
- 3 - غسل اليدين قبل وبعد الخروج من المختبر بالماء والصابون أو بمحلول مطهر، والعناية بنظافة الأظفار وقصها باستمرار. على أن يراعى ما يأتي:
- عدم استخدام قطع الصابون الصلبة في تنظيف الأيدي في المختبر كي لا تكون عاملاً لنقل الجراثيم من شخص لآخر، ويستعاض عنها بالصابون السائل .
- عدم استخدام المناشف القماشية التي تستخدم لأكثر من مرة ويستعاض عنها باستخدام مناشف ورقية تستخدم لمرة واحدة فقط وإذا كان لابد من استخدام المناشف القماشية فتستخدم لمرة واحدة فقط ، ولا يعاد استخدامها ثانية إلا بعد تعقيمها.
- 4 - عدم وضع الدفاتر والكتب على المنضدة .

- 5 - عدم التدخين والأكل داخل المختبر .
- 6 - عدم استعمال الماصات التي تحتاج استعمال الفم في مص المعلقات الجرثومية ، بل يجب استعمال أدوات سحب يدوية .
- 7 - تنظيف المكان قبل البدء بالعمل وبعد الانتهاء منه بالماء المضاف إليه قليل من ماء جافيل، لأن النظافة أمر ضروري جداً لنجاح العمل الجرثومي. ويجب أن يكون مكان العمل طاولةً ملساء مقاومةً للحموض والأسس والحرارة ، ويفضل أن يكون لونها أسود مما يسمح عادة بتمييز مستعمرات الجراثيم في المستنبتات الجرثومية ، 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 ونظافة المختبر 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 تلوثالخ.
- 12 - اتباع كل الشروط الصحية في التعقيم لتجنب تسرب الجراثيم الخارجية إلى العناصر المراد دراستها جرثومياً أو للأوساط الزرعية .
- 13 - قراءة التعليمات الخاصة بالتجربة بدقة قبل إتباع مراحل إجراء التجربة.

- 14 - عدم البدء بأيّ تجربة قبل التأكد من وجود المواد والتجهيزات والأدوات الضرورية لها كافة.
- 15 - عدم وضع إبرِ 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 خارج المخبر على الإطلاق .
- 18 - عند ترقيم الأطباق والأنابيب تستعمل أقلام خاصة لذلك ، أو تستعمل أوراق اللصق الخاصة مع الانتباه إلى عدم لصق هذه الأوراق باللسان، بل لصقها بقطرة من الماء. كما يجب تجنب وضع الأقلام في الفم خوفاً من العدوى بالجراثيم .
- 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 المعدة لذلك.
- 21 - عند استعمال المجهر بالتجارب ، وللحفاظ عليه وعلى نظافته وخاصة العدسات، يجب إتباع التعليمات الآتية :
- لا تلمس أبداً العدسات باليد، وإذا كانت متسخة امسحها برفق باستخدام الورق الناعم الخاص لذلك .

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

- أزل زيت الأرز بمسحه بكمية قليلة من (الزيلول) غول الخشب Xylol مباشرة عند انتهاء استخدامك للعدسة الغاطسة، لأن تجمّد زيت الأرز على عدسة المجهر يقتضي استخدام المحلات القوية مثل الزيلول بغزارة لحله. ويمكن أن يؤدي الاستخدام الكثيف والمتكرر لهذه المادة إلى حلّ المادة اللاصقة للعدسات .

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

22 - سجل ملاحظاتك مباشرة فور القيام بها وقدمها بتقرير للأستاذ المشرف وفق النقاط التالية والنموذج المرفق :

- عنوان التجربة ورقمها .
- غرض التجربة أو هدفها .
- طريقة العمل .
- النتيجة التي تكون مرتبة في جدول أو موضحة برسوم تخطيطية .
- المناقشة والخلاصة، حيث تعطي مفهوماً عاماً وشاملاً للتجربة ونتائجها .

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

الاسم :
التاريخ :
الفئة :
اسم التجربة :
الهدف من التجربة :
ملخص طريقة العمل :
النتائج :
المناقشة والخلاصة :

نموذج كتابة التقارير في عملي الجراثيم

تنظيف الأدوات الزجاجية المستعملة :

تزال جميع العلامات والكتابة المدونة على الأدوات الزجاجية ، ثم توضع الأدوات الزجاجية المحتوية على المزارع الجرثومية في الصاد الموصد Autoclave (المعقم) عند درجة حرارة 121°م وضغط 15 ليبرة/إنش² لمدة 15- 20 دقيقة، وذلك لقتل الجراثيم وإسالة الوسط الغذائي الصلب ، ثم تؤخذ، وهي ساخنة حيث تفرغ من محتواها، وتغسل حسب ما يلي:

1 - الأتابيب الزجاجية :

تغسل بالماء والصابون وباستعمال فرشاة خاصة ، ثم تشطف بالماء المقطر جيداً ، وتوضع مقلوبة في السلال المعدنية الشبكية الخاصة .

2 - أطباق بتري :

تغسل أطباق بتري الزجاجية بعد تفريغ محتوياتها بالماء والصابون، ثم تُغسل بالماء المقطر جيداً ، وتوضع مقلوبة في المكان المخصص لها .
أما أطباق بتري البلاستيكية فتعقم بالصاد الموصد ضمن أكياس خاصة متحملة للحرارة ، حيث يتم إتلاف الجراثيم بداخلها قبل أن ترمى، ويفضل أن توضع في المحرقة .

3 - الصفائح الزجاجية :

توضع الصفائح المستعملة في إناء حاوٍ على الماء والصابون، وتغسل كل واحدة منها بفرشاة خاصة وباستعمال صابون خشن لإزالة المواد الباقية عليها، ثم تشطف بالماء المقطر جيداً ، وتجفف، وتحفظ في صناديقها الخاصة. وقبل الاستعمال تمسك الصفيحة الزجاجية وتُعرضُ على اللهب للتأكد من جفافها وحرق ما تبقى على سطحها .

4 - الماصات :

تختلف طرق تنظيف الماصات باختلاف المواد التي تحتوي عليها، وكثيراً ما تنظف بالماء والصابون، ثم تشطف بالماء المقطر كالأدوات السابقة، أما عند احتوائها على مواد دهنية كالحليب مثلاً، فتغسل بالماء والصابون أولاً، ثم توضع في إناء طويل يحتوي على محلول منظف مؤلف من 25 غ كرومات الصوديوم الثنائية و1000 مل من حمض الكبريت الممدد،

بحيث يكون الطرف المدبب إلى الأسفل، وبعد ذلك تغسل جيداً بالماء المقطر
ثم تجفف وتعقم وتحفظ للاستعمال .

ملاحظة:

إذا أريد استخدام الأدوات الزجاجية في اختبارات حساسة ، يجب أن يتم
غسلها بالماء والصابون أولاً، ومن 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 .

الفصل الثاني

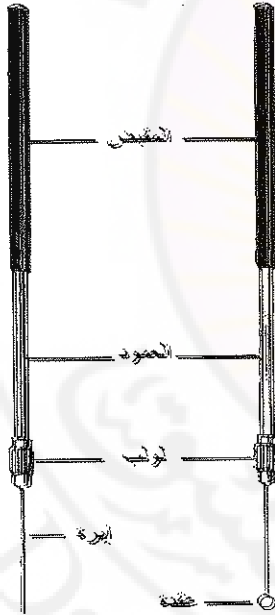
الأدوات والتجهيزات

الخاصة بالمختبرات الجرثومية

لا بد أن يحتوي أي مختبر جرثومي على الأدوات والتجهيزات الأساسية اللازمة لإجراء الاختبارات والتعقيم والحضن وغيرها .
الأدوات المستعملة في المختبر الجرثومي :
هناك مجموعة من الأدوات الأساسية في مختبر الجراثيم وهي :

1- قضيب البلاتين Platinum loop

ويستعمل لأخذ العناصر المرضية والعينات المختلفة وزرع الجراثيم ونقلها، وهو عبارة عن قضيب معدني ينتهي بسلك من البلاتين الذي يحمى بسرعة ويبرد بسرعة أو من معدن آخر لا يتأكسد عند تسخينه (مثال التتغستين) ويكون لسلك البلاتين أشكال متعددة منها المستقيم كالإبرة



Inoculation needles يستعمل للزرع

بالوخز وآخر حلقي Inoculation loop

needles ذو عقدة لأخذ المواد اللزجة

الشكل 2 :

(الشكل 2) .

قضيب البلاتين

2- ممص باستور pipette Pasteur

- يحضر عادةً من أنابيب زجاجية عادية قطرها الخارجي 6 مم والداخلي 4 مم وطولها حوالي 250 مم ، تسد من نهايتها بالقطن، وتعقم هذه الأنابيب بالفرن بدرجة 180°م خلال 30 دقيقة . ولتجهيزه نتبع الخطوات التالية :
- تسخن هذه الأنابيب من منتصفها على لهب بنزن حتى الاحمرار .
 - نشد نهايتي الأنبوب فنحصل على أنبوب شعري بقطر 1 مم تقريباً.
 - وعند الاستعمال نسخن هذا الأنبوب الشعري على اللهب فينقسم بتأثير الحرارة إلى قسمين فنحصل على ممصين شعريين مسدودين .
 - نكسر بملقط معدني معقم نهاية الأنبوب الشعري وبجانب النار ليبقى الأنبوب عقيماً، ونأخذ من ثم النموذج المراد دراسته بهذا الممص الشعري .

3- مسحة قطنية معقمة Sterile swab

- وهي سلك معدني أو عود خشبي يلف بأحد نهايتيه قطعة من القطن، توضع في أنابيب محكمة الإغلاق وتعقم لاستعمالها عند الحاجة إليها. (الشكل 3).

وتستخدم هذه المسحات لأخذ نماذج من اللوزتين والبلعوم والأغشية المخاطية. ومسحات الجدران والمنضدة..... الخ .

4- موقد بنزن Bunsen burner

- يستخدم 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 والأخماج وأطباق بيتري وأنابيب الاختبار.



الشكل 3

المسحة القطنية

الأجهزة المستخدمة في مختبر الجراثيم :

1- الصاد الموصد (المعقم أو الأوتوغلاف) Autoclave :

ويستخدم للتعقيم بالبخر تحت الضغط، وهي طريقة من طرق التعقيم بالحرارة الرطبة (الشكل 4) (أوتوغلاف يضبط يدوياً) ، (الشكل 5) (أوتوغلاف يضبط أوتوماتيكياً) .

وهو جهاز مكون من وعاء اسطواني الشكل مصنوع من معدن مقاوم يستتر بغطاء، فيه ثلاث فتحات: إحداها قابلة للسد والفتح لخروج الهواء والبخر، نسميها منفذ البخر. والفتحة الثانية متصلة للضغط والحرارة والثالثة سدادة أمان مجهزة بنابض قوته أقل من تحمل الوعاء وذلك لاتقاء خطر الانفجار .

يوجد داخل الجهاز سلة معدنية لوضع المواد المراد تعقيمها، يسخن هذا الجهاز بالكهرباء أو بالغاز .

تُعقم به جميع الأوساط الغذائية الزراعية التي لا تتخرب بدرجة الحرارة 121°م كما تعقم به جميع المواد الزجاجية والمعدنية والمطاطية والورقية المتحملة للحرارة ، ويعد- حالياً- من أسرع وسائل التعقيم وأسهلها .



الشكل 4

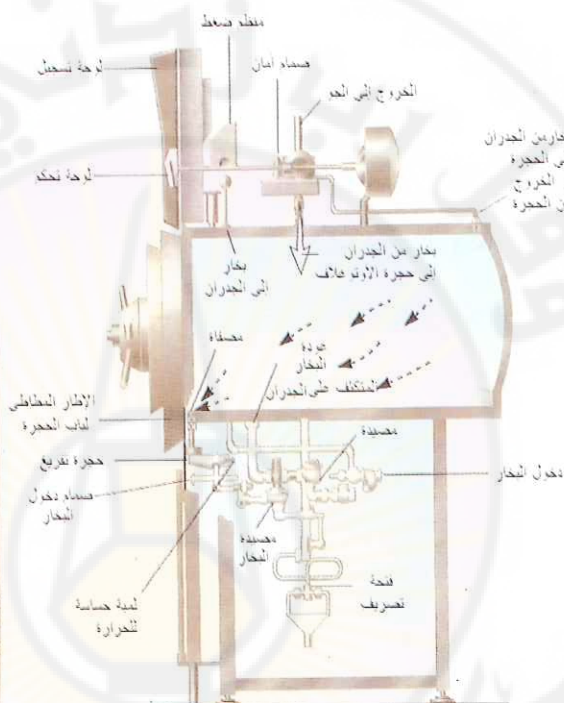
أوتوغلاف يضبط يدوياً

وتجدر الإشارة إلى وجود بعض المواد التي لا ينصح بتعقيمها بالأوتوغلاف، كما في المواد التي تتأثر بالحرارة المرتفعة، أو تلك التي لا تمتزج بالماء مثل الدهون والزيوت. وهناك طريقتان للتأكد من كفاءة التعقيم بالأوتوغلاف:

- الطريقة الحيوية Biotic method :

وتستند إلى وضع قصاصات من ورق الترشيح المعقمة والمشبعة بأبواغ Spores الجراثيم المحبة للحرارة المرتفعة Thermophilic bacteria أو تلك المقاومة لها Thermotolerant bacteria كما في Bacillus stearothermophilus في طبق بتري معقم، والذي يوضع بدوره في الأوتوغلاف في أثناء عملية التعقيم. وبعد انتهاء عملية التعقيم، تؤخذ القصاصات وتوضع فوق وسط غذائي مناسب لهذه الأبواغ الجرثومية ثم

A tall, dark-colored refrigerator with a large, square, metallic-looking door handle and a digital display on the left side. The refrigerator is shown against a plain background.



Chemical method الطريقة الكيميائية

31

انتهاء عملية التعقيم دليل على كفاءة التعقيم، وتأكيد على وصول درجة الحرارة داخل الاوتوكلاف إلى درجة انصهار المادة الكيميائية المستعملة.

2- أفران الهواء الساخن Ovens

يستخدم للتعقيم بالهواء الجاف، وهو عبارة عن 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 المستخدمة للتعقيم، ويجهز الفرن بمؤقت زمني يوقف الجهاز عن العمل عند انتهاء الزمن المحدد. (الشكل 6).

وتنظم الأفران على أن يكون فيها توزع الحرارة متجانساً وثابتاً في جميع أرجاء الفرن. لتعقم به جميع الأدوات الزجاجية والمعدنية من ملاقط وأطباق بتري وماصاتالخ، بعد لفها بالورق المقاوم للحرارة ووضعها في علب معدنية خاصة تسمى علب التعقيم حيث تحفظ العلب مغلقة بعد التعقيم لوقت الاستعمال.



الشكل 6
فرن

هذا ويجب سد الأنابيب والدوايق والمصاصات بسدادات قطنية قبل تعقيمها، كما يجب الانتباه إلى عدم فتح علب التعقيم قبل أن تبرد تماماً تحاشياً للتلوث بالمكروبات الخارجية التي تدخل مع دخول الهواء الخارجي .

3- الحاضنات Incubators

هي غرف معدنية تستخدم لحضن واستنبات الأحياء الدقيقة بعد زرعها على الأوساط الخاصة، تشبه أفران الهواء الساخن لكنها مخصصة للاستخدام بدرجات حرارة أخفض، ويجب أن يكون الارتياح 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 الميكروبية المراد استنباتها .



الشكل 7 : حاضنة مزودة
بجهاز هزاز Shaker

تم في السنوات الأخيرة استحداث تصاميم جديدة من حاضنات روعي في بعضها ضبط كل من نسبة ثاني أوكسيد الكربون والرطوبة أوتوماتيكياً داخل

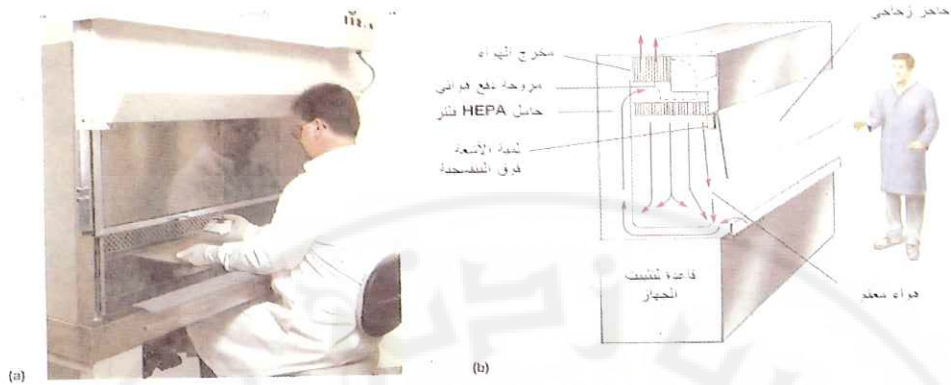
الحاضنة, فقد أصبح معروفاً أهمية تحضير بعض الأنواع الجرثومية الطبية
بخاصة في جو من ثاني أوكسيد الكربون يتراوح بين 5-8 %.
وزود بعضها الآخر بجهاز رجّاج Shaker يعمل على تهوية المزارع
الميكروبية النامية على الأوساط السائلة التي تؤثر فيها درجة التهوية على
إنتاجيتها من المواد الاستقلابية المختلفة (الشكل 7) .

4- غرفة الزرع الجرثومي (اللامينير) Laminar flow

ويطلق عليها أيضاً اسم غرفة العزل الميكروبي الآمنة Microbiological
Safety cabinet

وهي غرفة زجاجية مجهزة بمرشح تتراوح ثقوبه بين 0.2- 0.3
ميكرون ويجب أن يكون من الصف آ (100) (100) class A (100)، يمر الهواء
عبر المرشح ليخرج عقيماً وخالياً من جميع الأحياء الدقيقة (الشكل 8). ثمة
نموذجان لفرقة الزرع الجرثومي, وذلك حسب مكان المرشح في الجهاز
وحركة الهواء داخل الجهاز, هما النموذج العمودي والنموذج الأفقي.
يستخدم النموذج العمودي للزرع الجرثومي أما النموذج الأفقي فلا
يستخدم للزرع الجرثومي إطلاقاً.

كما يمكن أن تجهز هذه الغرفة بجهاز أشعة فوق بنفسجية ومصباح لهب
كحولي أو يعمل على الغاز لتعقيم إبر الزرع قبل الاستعمال وبعده, بالإضافة
إلى تجهيزها بمخلية هواء (فاكيوم) من أجل إجراء الاختبارات التي تحتاج
إلى عمليات ترشيح. ويمكن استخدام بعض غرف الزرع بوضع اليدين
داخلها من خلال فتحتين مزودتين بقفازين, كما يمكن رؤية الأدوات المتداولة
داخلها ومتابعة عمليات الزرع من خلال الواجهة الزجاجية.



الشكل 8

رسم يوضح أجزاء غرفة الزرع الجرثومي وحركة الهواء بداخله

5- ميزان حساس Micro balance

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



الشكل 9

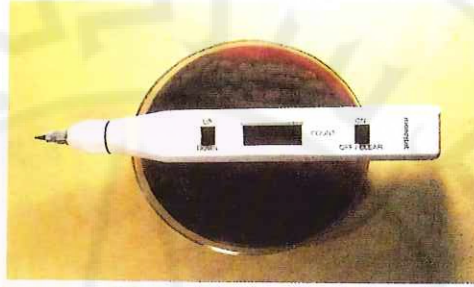
ميزان حساس

ولتلافي تأثير تيارات الهواء الجوي على تقدير أوزان الأجسام والمواد المختلفة، فقد تم صناعة الميزان الكهربائي ذي الكفة الواحدة في صندوق،

وفيه تبين شاشة العرض الوزن مباشرة لأقرب رابع رقم عشري، ودون الاستعانة بعلبة الموازين كما في الميزان العادي ذي الكفتين. (الشكل 9).

6- عدادات المستعمرات الجرثومية Bacterial colony counter

تستخدم لتسهيل عملية عد المستعمرات الجرثومية، وتكون بعدة أشكال (الشكل 10) :



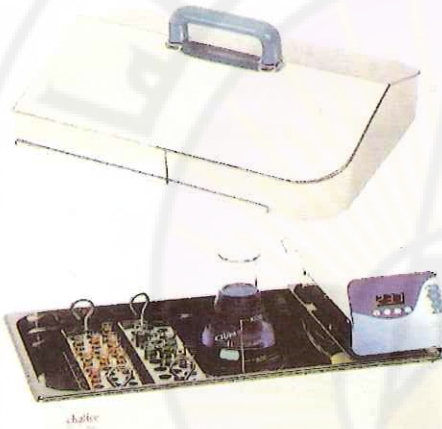
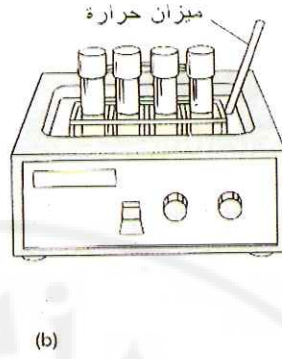
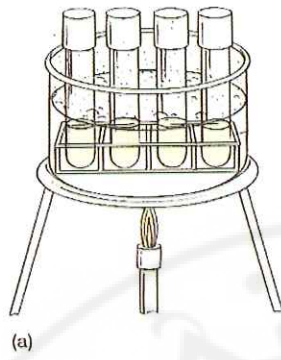
الشكل 10

نماذج من عدادات الجراثيم

7- حمام مائي Water-bath

تضبط حرارته بمنظم حراري دقيق، يستخدم لتحضير أوساط الاستنبات الصلبة وإسالتها وتحضير محاليل بعض المواد والملونات كما يستخدم لإجراء بعض الاختبارات الخاصة التي يجب أن تجرى بدرجات حرارة معينة .

ويستخدم الحمام المائي أيضاً في تبخير مذيبيات مواد النمو وبخاصة عندما نود الحصول على أشكال نقية ومركزة من مذيبياتها العضوية. حيث صممت أجهزة البخار الدوارة Rotarg eraporators التي يكون الضغط بداخلها أقل من الضغط الجوي. (الشكل 11).



الشكل 11 :
الحمام المائي

8- جهاز الطرد المركزي Centrifuge

ويسمى أيضاً بجهاز التنفيل (المثقلة) ويستخدم لفصل المواد المعلقة في محاليلها والكائنات الدقيقة المعلقة في أوساط استنباتها. وهو عبارة عن غرفة مزودة بمفاتيح للتحكم في كل من سرعة دوران الرأس، وزمن الدوران، ودرجة حرارة الغرفة، (شكل 12) وتتفاوت سرعة دوران الرأس الدوارة من جهاز لآخر، فقد تصل السرعة إلى نحو 50 ألف دورة في الدقيقة.



شكل 12
جهاز التثفيل (المثقلة)

9- جهاز الرج Shaker

ويستخدم في عمليات رج المزارع الجرثومية السائلة السائلة. وبخاصة تلك التي تحتاج إلى تهوية مستمرة بسبب توقف نشاطها وإنتاجيتها من المواد الاستقلابية على درجة تهويتها. وكثيراً ما يزود جهاز الرج بمفاتيح للتحكم في عدد الهزات المطلوبة في الدقيقة الواحدة (شكل 13).

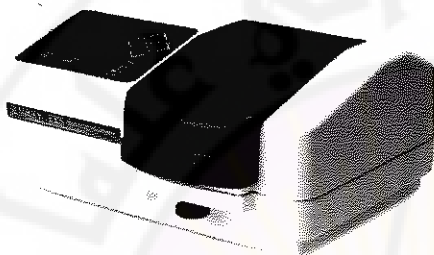


شكل 13
جهاز الرج Shaker

10- مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer

يستخدم مقياس الطيف الضوئي لتقدير النمو الكمي للجراثيم بشكل خاص والميكروبات بشكل عام وذلك من خلال معرفة كثافتها الخلوية، التي تختلف في قدرتها على امتصاص الأشعة فوق البنفسجية UV والأشعة المرئية والأشعة القريبة من تحت الحمراء (IR) Infrared. وقد يكون التقدير مباشر حيث يقيس الجهاز قدرة امتصاص الجراثيم للأشعة عند طول موجة محدد،

وقد يكون غير مباشر، فيقيس الجهاز قدرة امتصاص نواتج تحلل الجراثيم للأشعة عند طول موجة محدد أيضاً، عندما يتناسب امتصاص نواتج التحلل للموجة المحددة مع تركيز هذه النواتج، كما في تقدير تركيز البروتين من خلال تحلله بفعل الأنزيمات الجرثومية إلى أحماض أمينية (شكل 14).



شكل 14
مقياس الطيف الضوئي
Spectrophotometer

11- مقياس الرقم الهيدروجيني PH Meter :
يستخدم لتنظيم رقم حموضة أو قلوية الأوساط المغذية ولقراءة نتائج الاختبارات . وتتباين أجهزة تقدير الرقم الهيدروجيني في تصميماتها. إلا أن أحدثها النوع الإلكتروني الذي يعطي الرقم الهيدروجيني مباشرة. لكن هذه الأجهزة تحتاج لمعايرة مستمرة بالمحاليل المعيارية المرفقة.

12- جهاز تقطير المياه :
يستخدم للحصول على الماء المقطر على أن يكون الماء المقطر خالياً من عنصر النحاس الذي يُعدُّ من العوامل المثبطة لنمو الجراثيم إذ يوجد النحاس في الماء المقطر المستحصل بطريقة الأنبيق النحاسي.

13- جهاز لنزع الشوارد من الماء :
يستخدم لنزع الشوارد من الماء المراد استخدامه في تحضير أوساط الاستنبات .

14 - مخلية هواء (فاكيوم) :

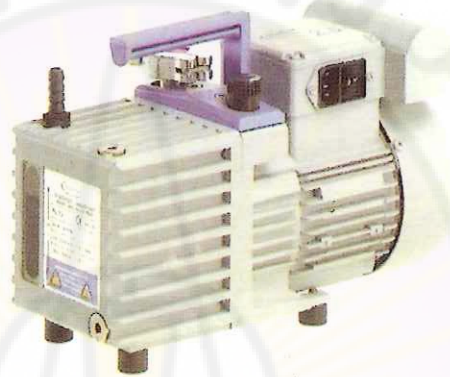
تربط هذه المخلية على أجهزة الترشيح ، لتسريع عملية الترشيح . (شكل 15).

وهناك أيضاً السخانات الكهربائية Electrical Hot plates والمقلبات الكهربائية Electrical Stirrers التي تستخدم في خلط مكونات المحاليل والأوساط الغذائية. والمحركات المغناطيسية Stirrers. (شكل 16) .



شكل 16

المحركات المغناطيسية Stirrers



شكل 15

مخلية هواء (فاكيوم)

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

15- المجهر Microscope :

نظراً لأهمية المجهر في علم الجراثيم ، ونظراً لتعدد أنواعه سنخصص لدراسة المجاهر فصلاً كاملاً هو الآتي.

الفصل الثالث

المجاهر

إن استعمال المجهر في دراسة الشكل الظاهري للجراثيم أمر ضروري ومهم نظراً لكون الجراثيم صغيرة الحجم بحيث لا يمكن رؤيتها وفحصها بالعين المجردة ، فهو الذي يساعدنا على تكبيرها وتمييزها. ثمة عدة أنواع من المجاهر، تختلف باختلاف تركيبها والغرض من استخدامها، ومن هذه المجاهر نذكر:

المجاهر الضوئية (Lm) : Light Microscope

يستخدم لدراسة الأحياء الدقيقة غير المرئية بالعين المجردة . حيث إنَّ حدود الرؤيا بالعين المجردة تساوي 0.1 ملم ، بينما تصبح بحدود 0.2 ميكرومتر باستعمال المجهر الضوئي .

تتلخص الطريقة التي يعمل بها المجهر الضوئي في إضاءة الجسم المراد دراسته بحزمة من الفوتونات يمكن زيادة شدتها باستعمال عدسات زجاجية مكثفة ، يضبط إحكامها بتحريكها آلياً. ويتم تكبير الجسم المفحوص بالعدسة الجسمية (الشيئية) Objective lenses التي تعطي صورة حقيقية مكبرة، يزداد تكبيرها بالعدسة العينية Ocular على أن يكون التكبير النهائي (قوة التكبير) هو حاصل جداء تكبير العدسة الجسمية في تكبير العدسة العينية المستعملتين .

وتجدر الإشارة إلى نقطة مهمة في تصميم المجاهر، وهي أن العامل المهم ليس فقط زيادة قوة التكبير Magnification وإنما هو قوة التمييز أو التوضيح (R.P) Resolution Power، وتعرف بأنها أصغر مسافة بين

نقطتين بحيث تبدو كل نقطة منها منفصلة عن الأخرى بوضوح، وهي تتناسب عكساً مع طول موجة الضوء المستعمل λ وطرذاً مع الفتحة العددية للعدسة الجسمية (N-A) Numerical Aperture ، التي تعبر عن النسبة بين قطر العدسة وبعدها البؤري. وتعد 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 أبي 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 .

$\sin \theta$ = 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 النفثالين.

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 17)



الشكل 17

مسار الأشعة الضوئية في المجهر الضوئي المركب

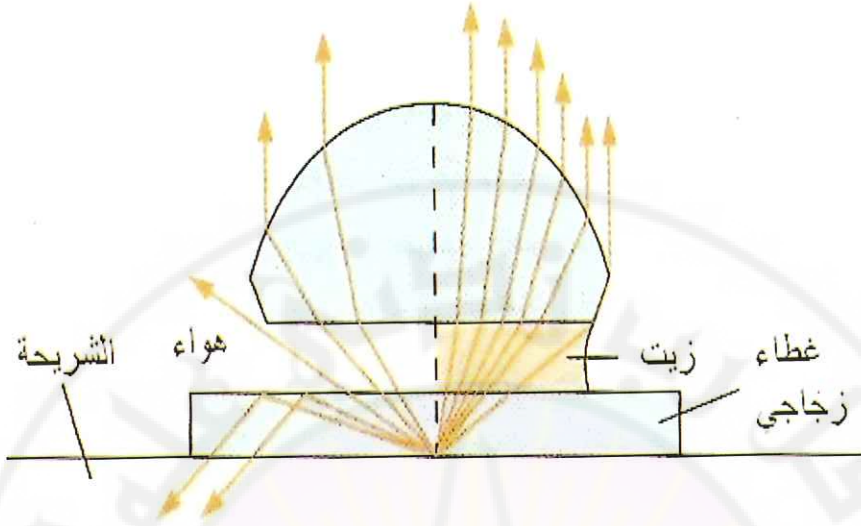
وهو المجهر المستعمل، وقد تعرف عليه الطالب في أكثر من مقرر فلا داعٍ للإسهاب في الشرح عنه، ويكفي أن نعلم أنه يتألف من جملتين هما :

أ - الجملة الآلية المؤلفة من القاعدة، والذراع، والأنبوبة التي تحمل العدسات العينية، والقرص الدوار حامل العدسات الجسمية، واللوحة التي تحمل الجسم

المدرّوس، ومجموعة اللوالب المستعملة لتحريك أنبوبة المجهر واللوحة والمكثف .

ب - الجملة الضوئية المؤلفة من المكثف الذي يتألف من مجموعة عدسات يقع بعدها البؤري في مركز الجسم المفحوص، ويزود المكثف بحظار ضوئي مركب من صفائح معدنية رقيقة هلالية الشكل تتحكم بكمية الضوء الواردة إلى الجسم المفحوص، وينحصر عمل المكثف على تجميع وتكثيف الضوء الوارد للعينة ، كما تتألف الجملة الضوئية من العدسات الجسمية والعينية التي توجد بتكبيرات مختلفة .

وإن أكثر ما يستخدم للدراسة الجرثومية العدسة الغاطسة ذات التكبير 90-100 ، ولكن- كما ذكرنا - المهم معرفة أن المشكلة ليست مشكلة تكبير بقدر ما هي مقدرة المجهر على تمييز الأجزاء الدقيقة المتجاورة بعضها من بعض أو ما يسمى بقوة التمييز (القوة الفاصلة) حيث إن زيادة التكبير تؤدي إلى ظهور صورة غير واضحة المعالم، لذلك عند استخدام العدسة ذات التكبير 90 أو 100 التي تدعى بالعدسة الغاطسة أو الزيتية، لا بد من غطس العدسة بزيت السيدر النقي (زيت الأرز) الذي يملك معامل انكسار للضوء يساوي 1.53 وهو نفس معامل انكسار الضوء والزجاج ، مما يؤدي إلى إيقاف بعثرة الضوء ومنع انكساره نتيجة نفاذه في وسطين متساويين في الكثافة (الزيت والصفحة الزجاجية) وذلك عكس ما يحدث إذا ما مر الضوء في الزجاج ذي قرينة الانكسار 1.53 إلى الهواء ذو قرينة الانكسار 1 مما يؤدي إلى انكساره وتشتيته ومن ثمّ عدم وضوح الرؤية. (الشكل 18) :



الشكل 18

رسم توضيحي يبين الفرق بين مسار الضوء باستخدام زيت الأرز من دونه

ولكن يجب ملاحظة ومراعاة ما يلي عند استعمال زيت الأرز :

- 1- يجب أن يكون الزيت خالياً من الشوائب .
- 2- يجب تنظيف العدسة الغاطسة بمادة الكزيلول 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 .

3 - مجهر الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet Light Microscope :

يستخدم في الدراسات الميكروبيولوجية وخاصة الجراثيم، ويختلف عن المجهر العادي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (U.V) بدلاً من الضوء المرئي، وبالمقابل يجب أن تكون عدساته من الكوارتز لتستطيع تأمين نفاذية

ومرور الأشعة فوق البنفسجية ، فهي لا تمتص الأشعة فوق البنفسجية كما تفعل العدسات الزجاجية . وتصل قوة التمييز فيه حتى 1000 Å .

4- المجهر الفلورسيني Fluorescence Microscope:

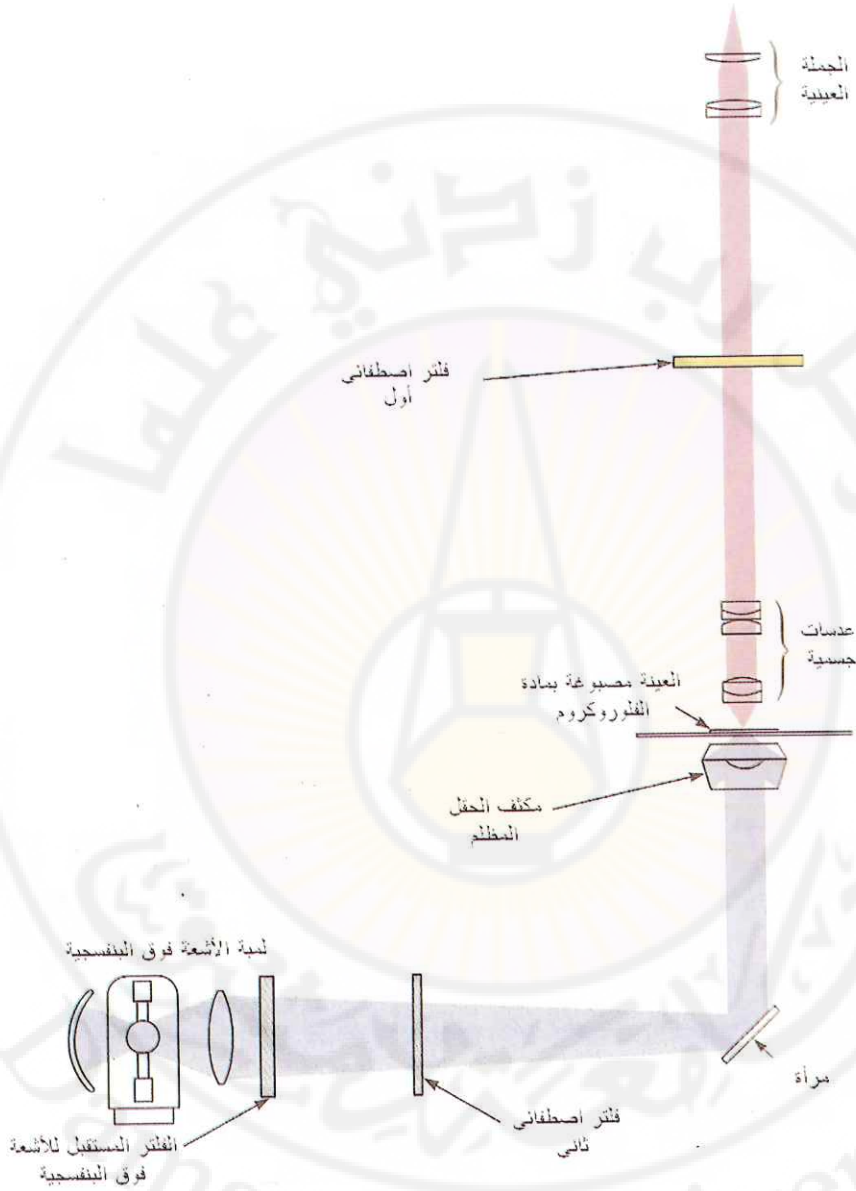
يفيد هذا المجهر بدراسة تفاعلات المناعة والأجسام المضادة Antibodies الموسومة أو المضاف إليها الأصبغة الفلورسينية مع مولدات الضد Antigens الموجودة على الأحياء الدقيقة، إذ تتحد الأجسام المضادة والأصبغة الفلورسينية اتحاداً كيميائياً، فتشكل جزيئات بروتينية فلورسينية كبيرة، تقوم - بدورها- بالاتحاد مع مولدات الضد فتبدو الأحياء الدقيقة المصبوغة بالفلورسين متوهجة عند فحصها بمجهر الأشعة فوق البنفسجية. تسمى هذه الظاهرة بالفلورة Fluorescence . ويسمى المجهر بالمجهر الفلورسيني. (الشكل 19).

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

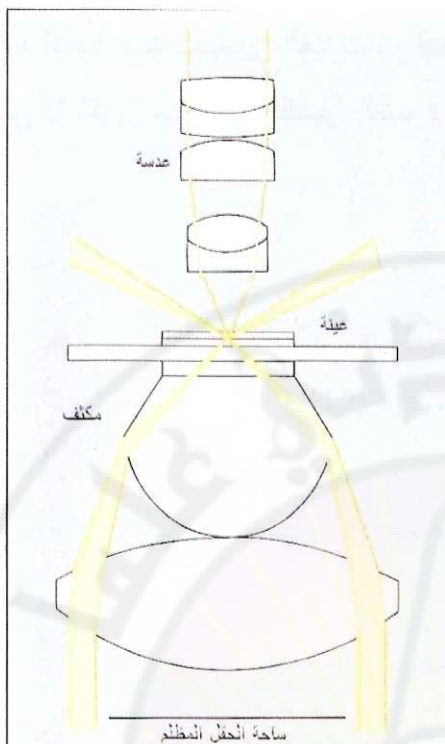
5 - مجهر الحقل المظلم Dark-Field Microscope :

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 المجهرى المظلم (الشكل 20)، وهنا لابد من أن نؤكد

على النظافة التامة عند تحضير العينات، واستعمال صفائح زجاجية خالية من الخدوش كي لا تكون سبباً في انكسار الضوء .



الشكل 19
آلية عمل المجهر الفلورسيني



الشكل 20

رسم يوضح انكسار الضوء في
مجهر الحقل المظلم

يستخدم هذا المجهر في دراسة الخلايا الحية غير المصبوغة وخاصة
لرؤية الحركة .

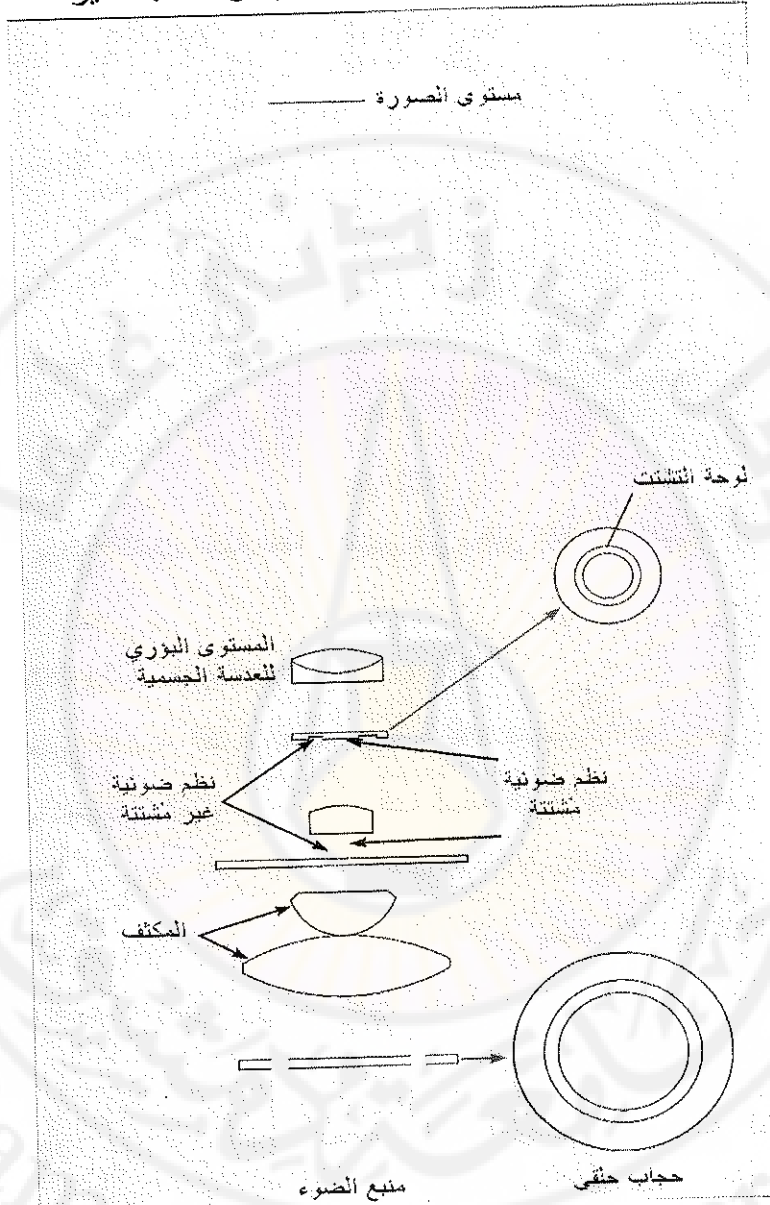
6- مجهر الأطوار المتباينة Phase Contrast Microscope :

يرتكز صنع هذا المجهر (الشكل 21) على ظاهرتين أساسيتين هما :

- ظاهرة انحراف الضوء نتيجة اختلاف قرائن الانكسار بين المكونات الخلوية المختلفة .
- إن الضوء الجانبي يؤخر أو يقدم $\frac{1}{4}$ الموجة الضوئية على ما هي عليه في المركز .

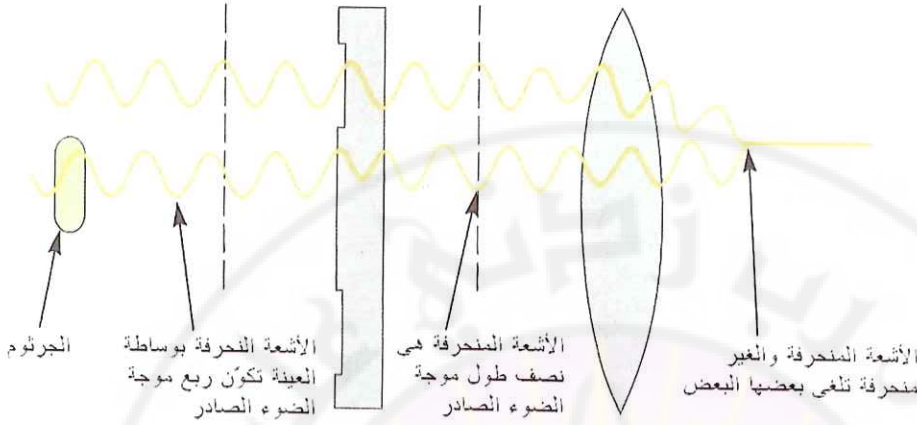
وبهذا فهو يحول الاختلاف الطبيعي للمكونات إلى اختلاف أقوى وأوضح بحيث يمكننا رؤية هذه المكونات الخلوية دون الحاجة إلى صبغها أو قتلها من جهة، كما أنه ينتج قوة تمييز أفضل للتفاصيل الدقيقة من جهة أخرى.

(الشكل 22)، يستعمل هذا النوع من المجاهر في الدراسات البيولوجية النظرية والتطبيقية وبخاصة فحص الخلايا الحية والأنسجة غير المصبوغة .



الشكل 21

مسار الضوء في مجهر الأطوار المتباينة



الشكل 22

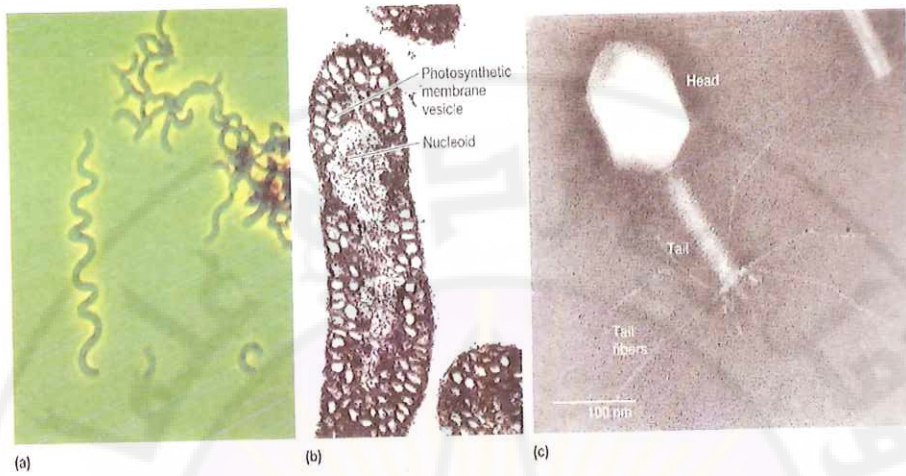
يوضح الشكل كيفية إحداث التباين في مجهر الأطوار المتباينة

المجاهر الالكترونية Electron Microscopes :

تتطلب دراسة البنية الدقيقة للخلية قوة فاحصة أكبر بكثير من تلك التي يعطيها المجهر الضوئي. لذلك يجب استعمال المجاهر الالكترونية التي لها نفس مبدأ المجاهر الضوئية مع العديد من الاختلافات. وتتميز المجاهر الالكترونية بأنها تمكننا من الحصول على تكبير يصل إلى (500000) مرة وبصورة واضحة، يمكن رؤيتها على شاشة أو تسجيلها على قلم تصوير حساس.

ونظراً لأن قوة التمييز تعتمد على طول موجة الأشعة المستعملة، فإن المجاهر الالكترونية تعد ذات قوة تمييز عالية مقارنة مع أفضل أنواع المجاهر الضوئية، (الشكل 23). إذ إنَّ الطول الموجي للشعاع الالكتروني

المستعمل لهذه الأنواع من المجاهر يمثل جزءاً صغيراً من الطول الموجي للضوء المرئي العادي .

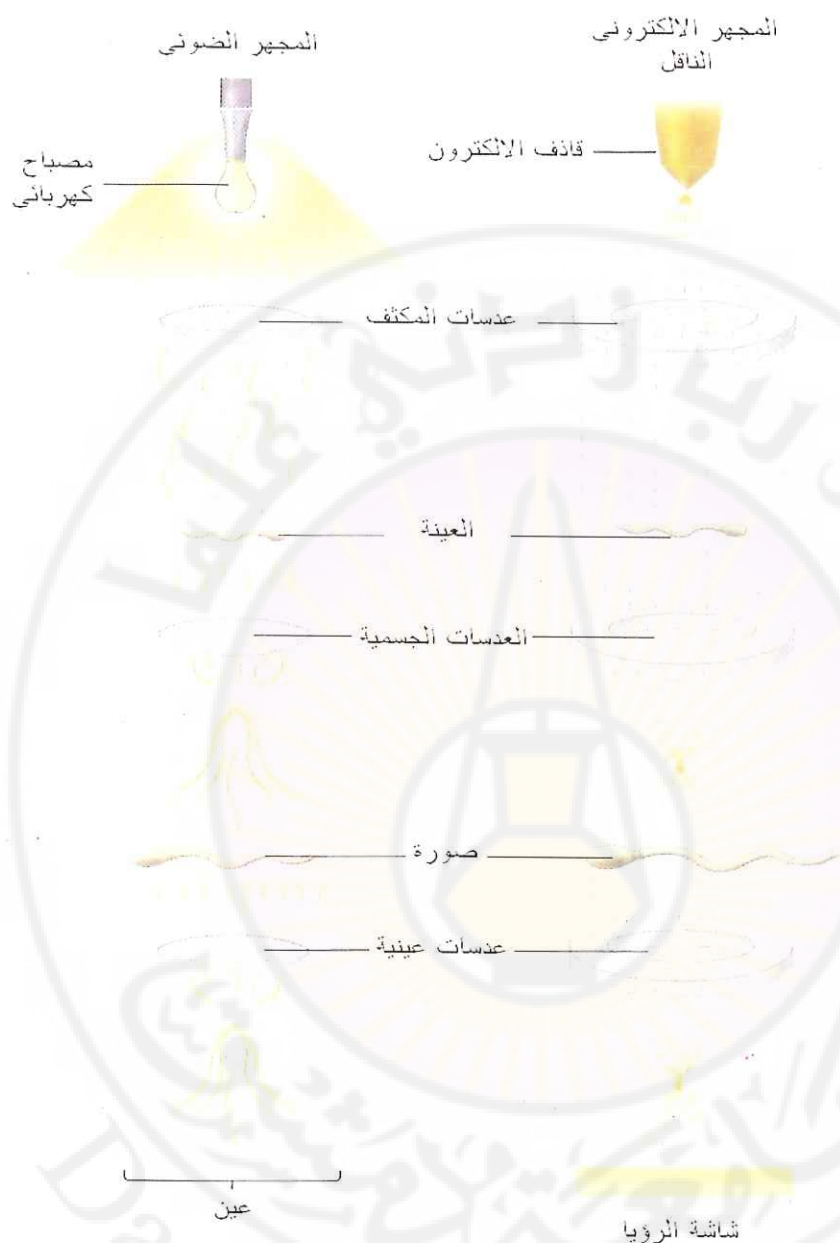


الشكل 23

مقارنة بين قوة تمييز المجهر الضوئي والمجهر الالكتروني

- a - نوع من الجراثيم الحلزونية كما تبدو بالمجهر الضوئي متباين الأطوار.
- b - مقطع في أحد الجراثيم الحلزونية كما تبدو بالمجهر الالكتروني الناقل بقوة تكبير $\times 100000$.
- c - ملتهم الجراثيم T4 كما يبدو بالمجهر الالكتروني الناقل بعد صبغها صبغاً سالباً .

وإن استعمال هذا النوع من الأشعة ذات الأمواج القصيرة ، منوط بإمكان إيجاد جهاز يستطيع التأثير في حزمة الإلكترونات بالطريقة نفسها التي يتأثر بها الضوء بالعدسات الزجاجية (الشكل 24) ويعد Bush أول من درس حركة الإلكترونات في حقل كهرومغناطيسي عام 1926 ، وأوجد بعد ذلك القواعد النظرية لبناء العدسات الكهرومغناطيسية.



الشكل 24
مقارنة بين طريقة عمل المجهر الضوئي والمجهر الالكتروني الناقلي

وتكون المجاهر الالكترونية بعدة أشكال :

1 - المجهر الالكتروني الناقل T.E.M. Transmission Electron Microscope : حيث بني تصميم هذا المجهر على طريقة المجهر الضوئي نفسها . (الشكل 25) .



الشكل 25

المجهر الالكتروني الناقل

و يتركب من منبع الكتروني حيث تتحرر الالكترونات من سلك من التنغستين، ونظراً لما تحمله هذه الالكترونات من شحنة كهربائية فإنه يمكن تسريعها في أنبوب الالكترونات وتجميعها باستخدام عدسة المكثف الكهرومغناطيسية، ثم تمريرها خلال الجسم المراد فحصه حيث يمتص بعضها وينعكس بعضها الآخر تبعاً لسماكة هذا الجسم وكثافته. فالمناطق التي

تسمح بعبور الإلكترونات تظهر نيرة، بينما تظهر المناطق التي تعكس الإلكترونات عاتمة أو داكنة، وتلك التي تعكسها بقدر ضئيل أقل دكانة، وبذلك تتكون صورة واضحة يمكن رؤيتها من نافذة الرؤية وعرضها على الشاشة الفلورسينية، كما يمكن التقاطها على لوحة فوتوغرافية بجهاز التصوير الذي يزود به عادة المجهر الإلكتروني. وهنا لابد من أن نشير إلى ضرورة تفريغ أنبوب المجهر بكامله في أثناء استعماله، لأن الإلكترونات ستسير بسرعة ثابتة ضمن حقل مفرغ تماماً من الهواء.

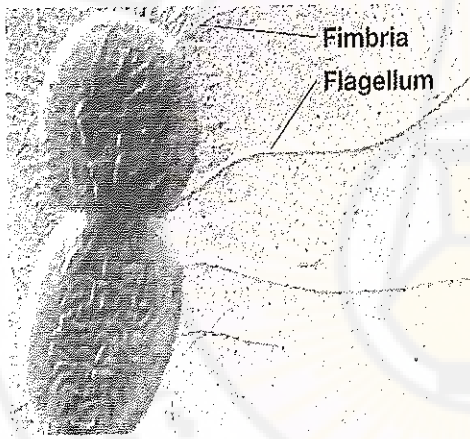
يستعمل هذا المجهر لدراسة مقاطع جافة من العينة (كي لا يعيق الماء مرور الإلكترونات) ومتناهية في الرقة Ultrathin Sections ويستعمل لهذا الغرض جهاز القطع فوق الدقيق Ultra microtome المزود بسكاكين من الزجاج أو الماس. وتخضع العينة المفحوصة بالمجهر الإلكتروني الناقل إلى سلسلة من العمليات المعقدة التي تحتاج لوقت طويل، حيث يجرى للعينة العمليات التالية :

1 - عملية تثبيت Fixation حيث توضع في محاليل التثبيت الكيميائية (الغلوتار ألدهيد أو رابع أوكسيد الأوزميوم OsO_4 أو كليهما معاً) كما تعرض للتثبيت الفيزيائي بطريقة التجريف أو تحت المتجمدات Freeze Etching .

2 - عملية تجفيف Dehydration (نزع الماء من العينة) وذلك بغمسها في محاليل ذات تراكيز تصاعدية من الإيثانول أو من الأسيتون وأكسيد البروبيلين .

3 - طمر في البلاستيك مثل راتنج الإيبون Epon resin أو أراالديت Araldite لتتسرب به.

- 4 - تعمل منها الرقائق المتناهية في الرقة (30-60 نانومتر) .
- 5 - تصبغ بملونات الكترونية (تحمل جزيئات تمتص أو تعكس الإلكترونات) مثل سترات الرصاص و خلاص اليورانيل، وهنا يكون الصبغ موجب
- Positive Staining أي أن الصبغة تدخل في العينة وتتحد مع بعض مكوناتها. وقد يكون الصبغ المستعمل سالباً Negative Staining أي الصبغة لا تدخل إلى داخل العينة ولكنها تحيط بها، وتملأ الشقوق التي على سطحها، مثل موليبيدات الأمونيوم أو أملاح بعض المعادن الثقيلة . (الشكل 26).



(a) *P. mirabilis*



(b) T4 coliphage

الشكل 26

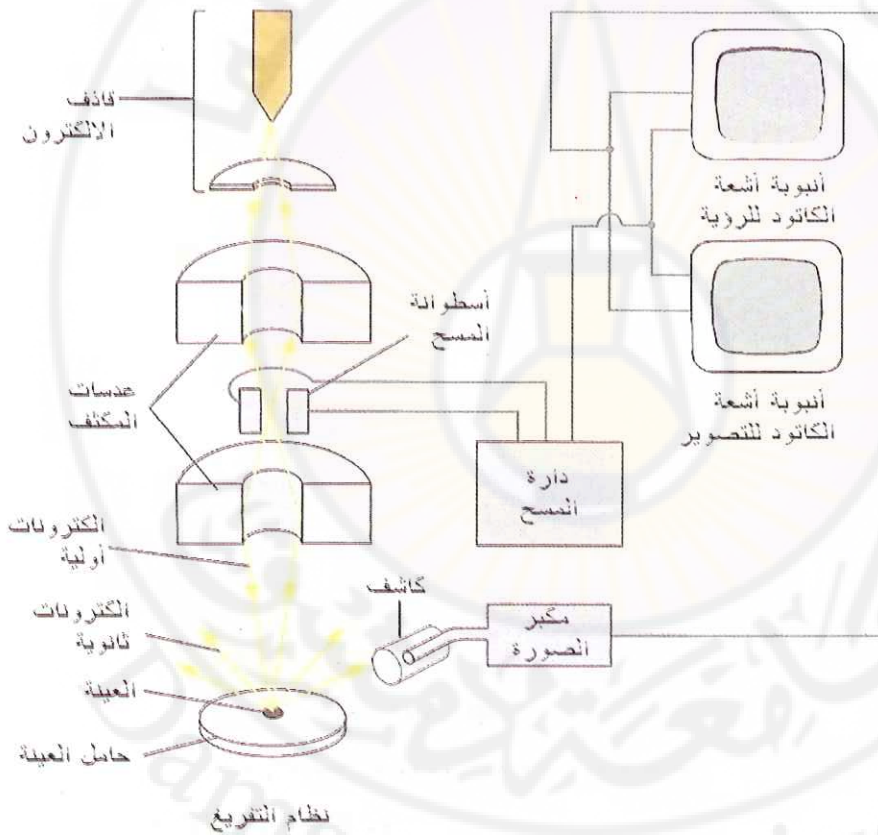
عينة مصبوغة لدراستها بالمجهر الالكتروني الناقل : أمثلة لعينات مدروسة بالمجهر الالكتروني الناقل بعد صبغها بمعدن اليورانيوم .

a - جراثيم *Proteus mirabilis* $\times 42.750$ ، لاحظ السياط والأهداب .

b - ملتهم الجراثيم T4 $\times 72.000$.

2 - المجهر الالكتروني الكانس أو الماسح Scanning S.E.M. :Electron Microscope

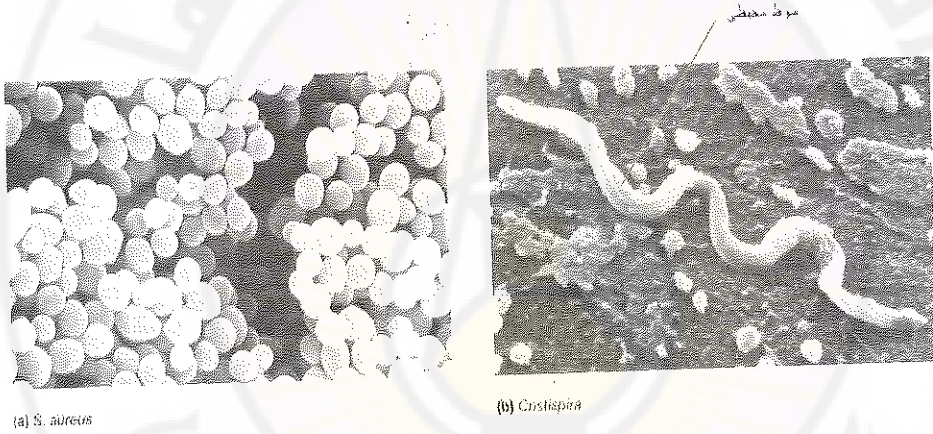
يتميز بعدة صفات منها: فحص مقاطع بيولوجية سميكة نسبياً. وفحص عينات رطبة. وإعطاء صورة نهائية ثلاثية الأبعاد مما يسهل معرفة التراكيب الجسمية بالإضافة لإعطائه صوراً تفصيلية دقيقة للسطوح الخشنة. (الشكل 27).



الشكل 27

المجهر الالكتروني الماسح

تتطلق الالكترونات في هذا المجهر من سلك رقيق من التنغستين لتمر على ثلاث عدسات كهرومغناطيسية، وملفات كائسة تسمح بتجميع مثالي للأشعة فوق العينة وبتحريك هذه الأشعة فوق سطحها لاختيار حقل الرؤية . يحرض سقوط الالكترونات على العينة المدروسة على صدور الكترونات ثانوية ضعيفة الطاقة تسقط بدورها على جهاز يضخم العينة، ويظهر دقائقها. تفحص الصورة النهائية للعينة برؤيتها عبر شاشة جهاز تلفزيوني والنقاط الصور المناسبة لها بآلة تصوير ملحقة بالمجهر . (الشكل 28) .



الشكل 28

أشكال بعض البكتريا كما تبدو بالمجهر الالكتروني الماسح

a - *Staphylococcus aureus* × 32.000 .

b - *Cristispira* × 6.000 .

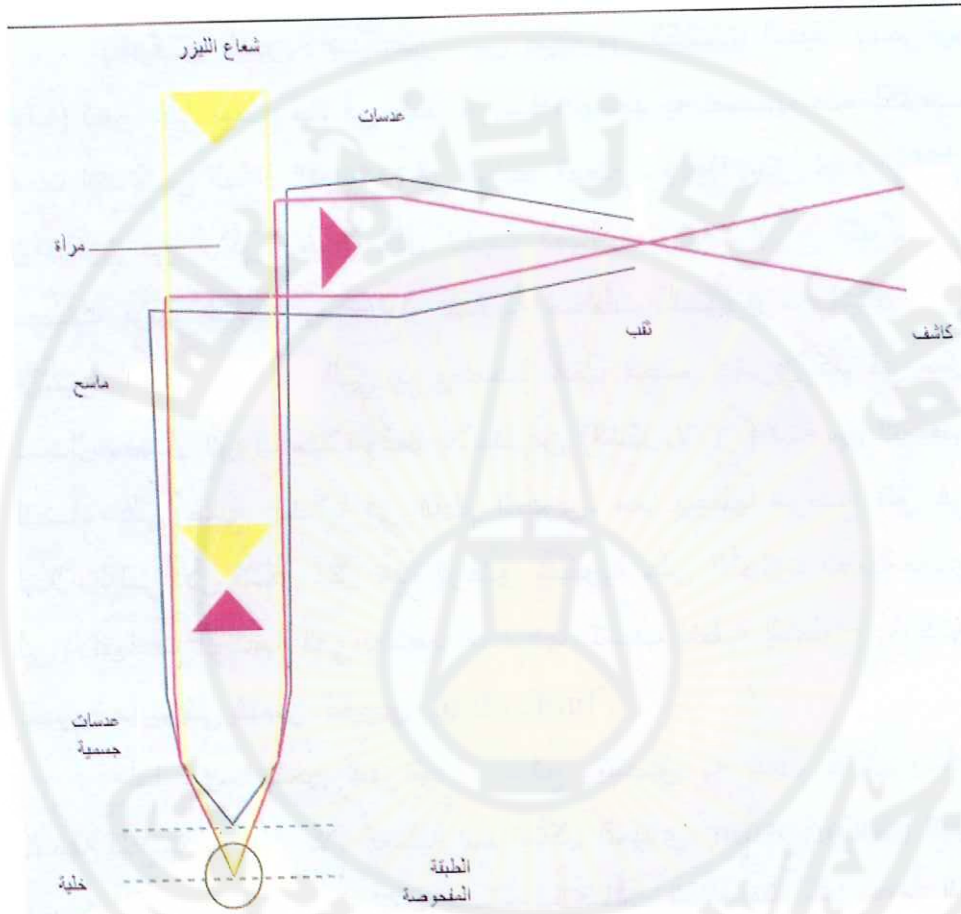
وبهذا نلاحظ أن الفرق الأساسي بين المجهرين الكانس والناقل هو أن الأشعة تسقط فوق العينة في الأول بينما تخترقها في الثاني . وهذا ما يجعل دراستنا الميكروبيولوجية متكاملة .

التقنيات الحديثة في الفحص المجهرى

Newer Techniques In Microscopy

- 1- الفحص المجهرى متحد البؤر (المبائر) Confocal Microscopy: تتميز العينات البيولوجية بكونها ثلاثية الأبعاد (الشكل 30 a)، وعندما يتم استعمال المجاهر الضوئية التقليدية في دراسة العينات البيولوجية ثلاثية الأبعاد فإن الضوء يمر عادة على جميع مناطق العينة، وليس فقط على الطبقة التي يتم التركيز عليها، ويكون الناتج صورة مشوشة وغير واضحة (الشكل 30 b).
- لقد تم حل هذه المشكلة بتطوير مجهر يدعى مجهر المسح الليزري متحد البؤر Confocal scanning laser microscope CSLM أو اختصاراً المجهر متحد البؤر (المبائر) Confocal microscope، يستعمل في هذا المجهر شعاع الليزر لإضاءة العينة بعد أن يكون قد تم صبغها بمواد متألقة مسبقاً. إن المكون الرئيس لهذا المجهر هو ثقب موجود فوق العدسة الشيئية أو الجسمية، يقوم بإزالة الأشعة الضوئية المنبعثة عن الأجزاء العلوية والسفلية للعينة والخارجة عن محور التركيز في العينة. وهكذا فإن الضوء الوحيد الذي يشكل الصورة هو المنبعث فقط من الطبقة المراد فحصها، ويكون الناتج صورة شديدة الوضوح لهذه الطبقة (الشكل 29).
- لقد أدخلت الحواسيب في هذه العمليات لتشكيل الصور متحدة البؤر. حيث يتلقى الحاسوب المتصل بالمجهر المبائر معلومات رقمية عن كل منطقة في العينة المفحوصة. وعليه يمكن استعمال هذه المعلومات لتشكيل صورة مركبة مفصلة وشديدة الوضوح (الشكل 30 c)، أو تشكيل تنظيم جديد ثلاثي الأبعاد للعينة (الشكل 30 d). وكذلك يمكن الحصول على صورة

مقطعية للمحور (X - Z) من خلال مقطع عرضي للعينة ، يعطي الفاحص مناظر للعينة وفقاً لأبعادها الثلاثة وحجمها الحقيقي (الشكل 30 e).



الشكل 29

مخطط يوضح مسار الأشعة في المجهر متحد البؤر

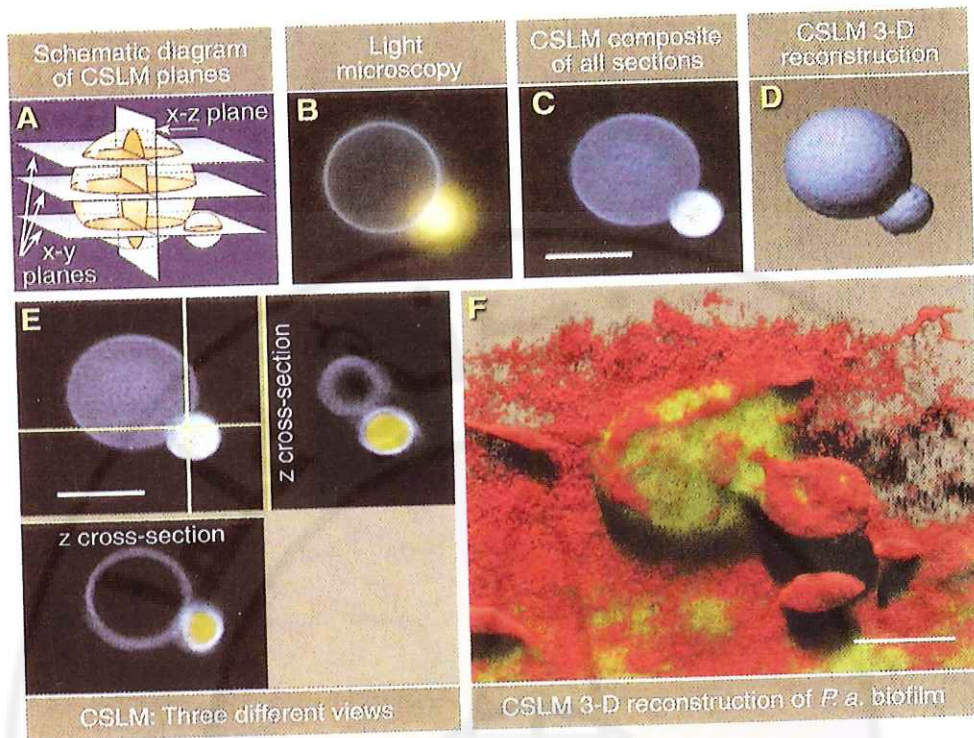
تمثل الخطوط الصفراء أشعة الليزر المستعملة في إضاءة العينة، أما الخطوط الحمراء فتعود إلى الضوء الصادر من الطبقة المفحوصة، والخطوط الزرقاء تعود إلى الضوء الصادر أسفل وأعلى العينة

هناك العديد من التطبيقات للفحص المجهرى المباتر (متحد البؤر)، تتضمن دراسة الأفلام أو الرقائق الحيوية Biofilms التي يمكن أن تتشكل على العديد من السطوح المختلفة .

والرقائق الحيوية هي عبارة عن طبقة من الكائنات الدقيقة (الجراثيم غالباً) تنمو على سطح ما، في طبقة من مادة بوليميرية تصنعها هذه الكائنات نفسها ابتداءً من المواد الموجودة في الوسط المغذي. ولهذا يمكن لهذه الرقائق أن تتكون في أماكن مختلفة مثل أنابيب المياه المنزلية وأبراج التبريد في محطات توليد الطاقة ومحطات معالجة مخلفات المجاري، وكذلك على الأسنان، أو في الأجهزة التي يتم وضعها داخل الجسم البشري كما في حال استبدال مفصل الورك مثلاً، وكما يلاحظ من (الشكل 30 f) فإنه من الصعب القضاء على جميع الخلايا في الفيلم الحيوي، مما يجعلها موضع قلق في الحقل الطبي لأن تشكل مثل هذه الرقائق الحيوية على الأجهزة الطبية يؤدي إلى الالتهابات الإنتانية التي يصعب معالجتها. تسبب تغطية السطوح بالرقائق الحيوية ما يسمى التعفن الحيوي biofouling .

أما عندما تتخر الجراثيم السطح وتلتصق به بفعل التآكل ومادة لاصقة فإنه يطلق على هذه العملية اسم التآكل الحيوي biocorrosion الذي قد يستمر أوقاتاً تختلف باختلاف السطح والكائنات الملتصقة، مما يؤدي إلى إعطاء سطح أكثر خشونة وأكثر لصوقية من الناحية الكيميائية .

لقد تم تعريض الفيلم الحيوي لمضاد جرثومي، ثم تم تلوينه بأصبغة تمكن من التمييز بين الخلايا الحية (الخضراء) وبين الخلايا الميتة (الحمراء) . لقد قتلت الخلايا الموجودة على سطح الفيلم الحيوي بينما لا تزال الخلايا الموجودة في الطبقات السفلى من الفيلم الحيوي حية .



الشكل 30: المجهر الضوئي والمجهر متحد البؤر

نمطين من الكريات (القطرات) مفحوصة بواسطة المجهر الضوئي والمجهر متحد البؤر - الصور المشاهدة باستعمال المجهر الضوئي تشكلت من خلال الضوء الذي مر على جميع مناطق العينة ثلاثية الأبعاد، بينما تشكلت الصور المشاهدة باستعمال المجهر متحد البؤر من الوحيد الذي مر على الطبقة المركز عليها (طبقات عديدة يمكن فحصها ضمن العينة وتستعمل لرسم صور واضحة ذات تفاصيل دقيقة). a - الطبقات التي يمكن ملاحظتها باستعمال المجهر متحد البؤر. b - صورة لنفس القطرتين المدروسة في a ولكن باستعمال المجهر الضوئي، لاحظ عدم وضوح أي من القطرتين، وكذلك فإنه من الصعب تمييز القطرة الصغيرة كقطرة. c - يستطيع الكمبيوتر (الحاسوب) المتصل بالمجهر متحد البؤر عمل صورة مركبة لكلا القطرتين، وذلك بجمع المعلومات الرقمية لكل طبقة من الطبقات المشكلة لهاتين القطرتين، والنتيجة يكون صورة واضحة ذات تفاصيل دقيقة. d - يستطيع الكمبيوتر أيضاً استعمال المعلومات الرقمية لكل طبقة موجودة ضمن هاتين القطرتين لتشكيل تنظيم جديد ثلاثي الأبعاد لهما. e - صورة العينة المشكلة بالكمبيوتر. f - صورة ثلاثية الأبعاد مأخوذة من الفيلم الحيوي لجراثيم

Pseudomonas aeruginosa

2 - الفحص المجهرى بالمسبار الماسح Scanning Probe Microscopy:

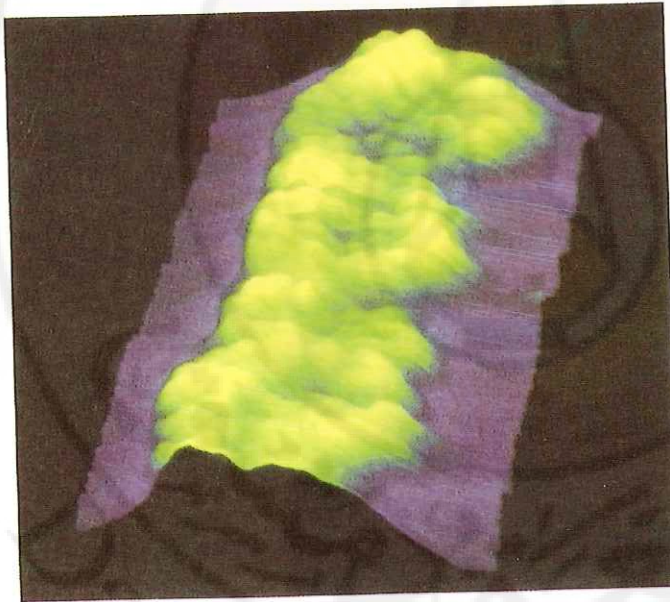
بالرغم من أن المجاهر الضوئية والالكترونية أصبحت عالية الدقة ووصلت لمرحلة متقدمة من التطور ، فإنه مازال هناك تطوير لمجاهر ذات إمكانيات أكبر . فهناك صنف جديد من المجاهر تسمى مجاهر المسبار الماسح Scanning Probe Microscope يتم فيها قياس مواصفات السطح بإمرار مسبار حاد sharp probe على سطح العينة .

إن مجهر المسح النفقي Scanning Tunneling Microscope الذي صنع عام 1980 هو مثال ممتاز لمجهر المسبار الماسح. إذ يمكن الحصول على تكبير بمقدار 100 مليون، مما يسمح للعلماء من مشاهدة الذرات على سطح المواد الصلبة . حيث تتخذ الالكترونات المحيطة بالذرات مساراً كالنفق عبر حدود السطح لمسافة قصيرة جداً ومجهر المسح النفقي مزود بإبرة تشبه المسبار ذات رأس حاد جداً (مدبب) لدرجة أنه كثيراً ما يحمل في رأسه ذرة واحدة. يتم إنزال المسبار باتجاه سطح العينة حتى تستطيع الالكتروناته لمس الالكترونات سطح ذرات العينة ، فإذا ما تم تطبيق تيار كهربائي بفولت منخفض بين رأس المسبار وسطح العينة فإن الالكترونات تبدأ بالتدفق عبر قناة ضيقة في هذا التجمع الالكتروني. يتمتع هذا التيار التدفقي بحساسية عالية جداً للمسافة ، فهو ينقص بمقدار ألف مرة إذا ما أبعد المسبار عن سطح العينة مسافة تعادل طول قطر ذرة ما .

يتم تحديد ترتيب الذرات على سطح العينة بتحريك رأس المسبار ذهاباً وإياباً على السطح مع إبقاء ارتفاعه ثابتاً فوق العينة، وذلك بتعديل بعد المسبار عن العينة، وبحيث يبقى التيار التدفقي ثابتاً . عندما يتم تحريك رأس المسبار إلى الأعلى والأسفل تبعاً لتعاريج سطح العينة، فإن هذه الحركة يتم

تسجيلها وتحليلها بالحاسوب وذلك للحصول على صورة دقيقة وثلاثية الأبعاد لسطح الذرات . وهذه الخارطة السطحية يمكن عرضها على شاشة الحاسوب أو طباعتها على الورق . وتكون دقة الصور عالية جداً بحيث يمكن بسهولة فحص كل ذرة بمفردها .

لقد تقاسم مصممو هذا المجهر Gerd Binning & Heinrich Rohrer عام 1986 جائزة نوبل للفيزياء على عملهم هذا مع العالم Ernst Ruska المصمم لأول مجهر الكتروني ناقل Transmission Electron Microscope. لقد كان لمجهر المسح النفقي أثراً كبيراً في البيولوجيا. حيث يمكن استعماله بشكل مباشر لمشاهدة DNA والجزيئات البيولوجية الأخرى (الشكل 31).



الشكل 31 :
صورة للدنا
DNA كما ترى
بمجهر المسح
النفقي

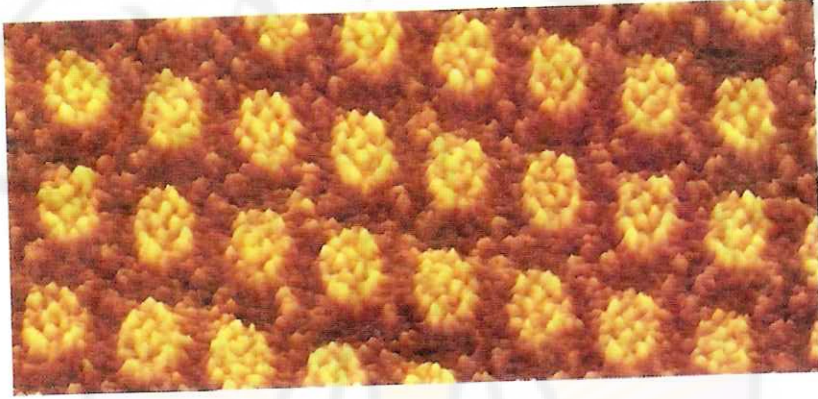
بما أن المجهر يُمكن من فحص الأجسام وهي مغمورة بالماء لذا فإن له أهمية خاصة في دراسة الجزيئات الحيوية .

ومؤخراً تم تطوير نمط ثانٍ من مجهر المسبار الماسح، هو مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscope حيث يتم تمرير مسبار مدبب فوق العينة مع إبقاء المسافة بين رأس المسبار والسطح ثابتاً. ويتم هذا بتطبيق قوة صغيرة جداً على رأس المسبار، يجب أن تكون كافية للحفاظ على المسافة دون أن تؤدي إلى إعطاب سطح العينة. ويتبع الحركة الشاقولية لرأس المسبار قياس انعكاس شعاع الليزر الذي يضرب حامل المسبار (الشكل 32) .



الشكل 32
العناصر الأساسية بمجهر القوة الذرية

وعلى عكس مجهر المسح النفقي فإن مجهر القوة الذرية يستعمل لدراسة التآثرات Interactions بين البروتينات المرافقة من نوع GroEl و GroEs في جرثوم *E. coli* . وكذلك لرسم خارطة البلاسميدات من خلال تقييد أنزيمات الاقتطاع restriction enzymes في مواقع محددة، ولتتبع سلوك البكتيريا الحية وغيرها من الخلايا، ولإظهار بروتينات الأغشية الخلوية. (الشكل 33) .



(a)



(b)

شكل 33:

شكل يوضح الغشاء البروتيني المائي المدروس بمجهر القوة الذرية تمثل بنية الأكوابورين Aquaporin وهو عبارة عن غشاء بروتيني يسمح لجزيئات الماء بالمرور من خلاله . a - تشير كل دائرة إلى صورة سطحية لغشاء بروتيني مفرد . b - تكبير لجزيئة البروتين المائي الأكوابورين المفردة يوضح تفاصيلها .



الفصل الرابع

التعقيم

STERILISATION

تعريف التعقيم:

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

وبما أن كل ما يحيط بنا من هواء وتراب وماء مفعماً بالجراثيم المختلفة وأبواغها، لذلك يعد التعقيم من أهم الأسس التي تركز 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 وخاصة عند وجود جراثيم غير متبوغة حيث يتساوى المعنيان .

وقد عرّف بعضهم عملية التطهير بأنها قتل الجراثيم الممرضة .

ومن غير الممكن الشروع بأي عمل يتعلق بزراعة الجراثيم وعزلها دون التعرف مسبقاً على الطرق التي تسمح بتجريد أوساط الزرع والسوائل والأدوات المستخدمة من العضويات المجهرية العالقة بها ، فالتعقيم هو أساس التقنية لعلم الجراثيم .

آلية التعقيم:

تختلف آلية التعقيم باختلاف الطريقة المستعملة، ولكنها تؤدي في النهاية إلى تثبيط أحد الأنزيمات أو كلها الموجودة في الخلية، أو قتلها مما يؤدي إلى وقف عمليات الاستقلاب الخلوية، ومن ثمّ وقف قدرتها على النمو والتكاثر .

ويجب أخذ الآتي في الحسبان عند التعقيم:

معدل موت الخلايا الجرثومية :

عندما تتعرض المستعمرات الجرثومية للتعقيم فإنها لا تموت كلها في معاً، وإنما يحدث ذلك في أوقاتٍ متقطعة، حيث إنّ عدد الخلايا الميتة يتناسب مع زمن التعقيم أو شدته، مما يحتم علينا مضاعفة الزمن أو الطاقة الحرارية أو شدة الإشعاع عند زيادة 99.9 % من الخلايا الجرثومية بدلاً من 99 % كما تلزم المضاعفة مرة أخرى عند زيادة الإبادة إلى 99.99 % وهكذا. وكثيراً ما نعتمد على قواعد معينة وثابتة للحصول على تعقيم جيد .

مقاومة الجراثيم :

يختلف رد فعل الجراثيم للتعقيم باختلاف النوع الجرثومي، وبصورة عامة فإن الجراثيم الموجودة في أوساطها الطبيعية تقاوم التعقيم أكثر من تلك الموجودة في الأوساط الصناعية. 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 بإحدى الطرائق الآتية :

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

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

3- الأنابيب الشاهدة : وتستخدم 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 تتصهر المادة، وتنتشر عبر الملون وتلون الأنابيب. من المواد المستعملة Antipyrine الذي ينصهر عند الدرجة (114° م) وحمض البنزويك Benzoic acid الذي ينصهر عند الدرجة (121° م) وتدل الأنابيب السابقة على الوصول إلى درجة الحرارة المطلوبة، ولكنها لا تعطي أي فكرة عن المدة التي تبقى عليها .

4- المشعرات اللونية : تتميز بعض المواد بقدرتها على إعطاء لون رمادي ثم أسود، وذلك 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 الليثيوم (كبريتات أو كربونات الليثيوم) من أكثر المواد المستعملة .

طرائق التعقيم: تضم الطرق الشائعة للتعقيم استخدام الحرارة الجافة أو الرطوبة والترشيح والإشعاعات وأحياناً استخدام بعض المواد الكيميائية، وخاصةً الغازية للتعقيم على البارد، ولكل من هذه الطرق استخداماتها .

أولاً: التعقيم بالحرارة:

1- التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat :

تقوم الحرارة الجافة بأكسدة المركبات الكيميائية للخلية. وكثيراً ما تستعمل إحدى الطريقتين الآتيتين :

أ - التعقيم باللهب : يمكن أن نستعمل باللهب (غاز - مصباح كحولي) للتعقيم الآني أو المؤقت بعمليتي الإحماء والتلهيب .

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

التلهيب: وذلك بتعريض الأشياء الملساء كأطراف الممص والقضبان الزجاجية وفوهات الأنابيب والقوارير للهيب. بإمرارها (3-4) مرات بحركة ليست بالسريرة أو البطيئة مع تدويرها. أما المشارط المعدنية فتعقم بغمسها في الكحول أولاً، ثم تعريضها إلى باللهب .
يقسم باللهب إلى ثلاثة أقسام :

- القسم السفلي: تكون درجة حرارته منخفضة نوعاً ما، ويستعمل عادةً لتعقيم الصفائح الزجاجية وفي حال تثبيت اللطخة الجرثومية (الغشاء الجرثومي) .

- القسم المتوسط: تكون حرارته أكثر ارتفاعاً ويستخدم لتعقيم إبر التلقيح وفوهات الأنابيب والأرلينات والسدادات .

- القسم العلوي: تكون درجة حرارته منخفضة نوعاً ما بالإضافة لوجود هباب الفحم في حال عدم الاحتراق الكامل، لذلك نتجنبه في عمليات تحضير الغشاء الجرثومي خشية التأثير على نظافة الصفيحة الزجاجية ومن ثم عدم وضوح الرؤية .

ب- التعقيم بأفران الهواء الساخن : يستند مبدأ هذه الطريقة إلى رفع درجة حرارة الهواء الموجود داخل الأفران، وضبط هذه الدرجة بالمنظم الحراري (الترموستات) على أن تبقى ثابتة طيلة مدة التعقيم .
أما الحرارة الأكثر استخداماً فهي من (160°م) حتى (190°م) .
وهذا جدول يبين الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الجافة بمختلف درجات الحرارة .

جدول رقم 1 / يبين الزمن المناسب الموافق للحرارة الجافة المستخدمة للتعقيم

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

تعقم بهذه الأفران جميع الأدوات المعدنية والزجاجية بعد لفها وتثبيتها لمنع تلوثها، بعد إخراجها من الفرن .

2- التعقيم بالحرارة الرطبة Water heat :

تقوم الحرارة الرطبة بتخثر سريع لبروتينات الخلايا ، ويمكن إجراء التعقيم بالحرارة الرطبة بعدة طرق :

أ - التعقيم بالبخار تحت الضغط : يعتمد مبدأ هذه الطريقة على التسخين في جو مشبع ببخار الماء، وتحت ضغط مناسب .

وكما هو معروف فإن درجة غليان الماء ترتفع كلما ارتفع الضغط فوق سطحه، فالماء يغلي عند الدرجة (100°م) تحت الضغط الجوي العادي

(1جو) أو صفر ليبرة/إنش²، وهناك تناسب طردي بين زيادة الضغط وارتفاع درجة حرارة غليان الماء ، كما هو مبين بالجدول الآتي:

جدول رقم 2/ يبين درجة حرارة غليان الماء المقابلة للضغط المطبق على سطحه في

جهاز التعقيم Autoclave

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

وهذه الطريقة من أفضل طرق التعقيم وأكثرها استخداماً . كما أنها تمتاز بميزيَّتين الأولى التسخين السريع، والثانية: وفرة الرطوبة. ممَّا يسهل عملية تخثر البروتينات الخلوية بزمان قصير. وهذا جدول يبين الزمن اللازم للتعقيم بالحرارة الرطبة بمختلف درجات الحرارة:

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

درجة الحرارة المثوية	الزمن بالدقيقة	الضغط (البيرة/ إنش ²)
°121	15	15
°126	10	20
°134	5	30

ويستعمل لهذا الغرض جهاز Autoclave أو ما يسمى بالصاد الموصد (راجع بحث الأدوات والتجهيزات الخاصة بالمخابر الجرثومية) أما طريقة استعمال الجهاز فهي كالآتي:

توضع المواد المراد تعقيمها بالسلة المعدنية المرفقة بالجهاز، ويوضع كمية كافية من الماء في الجهاز حسب التعليمات الواردة في دليل تشغيل الجهاز، 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 بشكل صفارة متواصلة، عندها نغلق منفذ البخار، فتبدأ إبرة مقياس الضغط بالحركة أي يبدأ الضغط بالارتفاع، وترتفع معه درجة الحرارة. ومتى وصل مقياس الضغط للدرجة المطلوبة يخفف منبع الحرارة، وينظم الجهاز على تلك الدرجة من الحرارة لمدة كافية، وعادة المدة الكافية للتعقيم هي 15 - 20 دقيقة بدرجة 121°م تحت الضغط 15 ليبيره/إنش² 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 .

- ينبغي ملاحظة ما يلي عند التعقيم بجهاز الـ Autoclave :

1- يعتبر بدء التعقيم اعتباراً من الوصول للحرارة المطلوبة 121°م ويجب أن تبقى هذه الحرارة ثابتة خلال مدة التعقيم .

2- لا يبدأ برفع الضغط في الصاد الموصل إلا بعد طرد الهواء كلياً، ووجود الهواء داخل الصاد الموصل يؤثر على عملية التعقيم؛ لأن نفوذ الحرارة الرطبة في الجسم أشد من نفوذ الحرارة الجافة. وهذا ما يعلل بأن التعقيم في الصاد الموصل يجري بدرجة حرارة أقل وزمن أقصر مما يستعمل في طريقة التعقيم بالحرارة الجافة .

كما أن بقاء الهواء داخل الجهاز من شأنه أن يخفض درجة الحرارة المسجلة مقارنة بالضغط المشار إليه بالجهاز. فالضغط لا يقتل الأحياء، وإنما درجة الحرارة العالية للبخار المضغوط هي التي تقتل الخلايا. بالإضافة إلى أنه عندما تتناقص نسبة الرطوبة تزداد وبشكل واضح مقاومة الجراثيم لدرجات الحرارة العالية .

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

4- بعض الفطور والجراثيم يقاوم حتى درجة 130°م ، كما أن بعض الأبواغ الموجودة في التربة تقاوم الحرارة ولا تتلف إلا بدرجة 140°م مدة 20 دقيقة، لذا يجب الانتباه إلى ذلك عند التعقيم .

- تستخدم 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 100°م أو التندلة Tantalization : سميت هذه الطريقة بالتندلة نسبة إلى الباحث تندال مكتشف هذه الطريقة في التعقيم ، وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد التي تتغير خواصها الطبيعية أو الكيميائية وتتخرب بدرجات الحرارة العالية .

وتتم هذه الطريقة بجهاز خاص يدعى آرنولد Arnold وهو نوع من الصاد الموصد يحتوي على منفذ للبخار يبقى مفتوحاً بشكل لا يسمح بتجاوز درجة الحرارة 100°م ، أو يمكن أن نستخدم الصاد الموصد نفسه بعد فتح منفذ البخار، ويجري التعقيم فيه بتعريض الأوساط المراد تعقيمها للبخار ثلاث مرات لمدة 1/2 ساعة في ثلاثة أيام متتالية متناوبة مع أوقات من الحضان، ممّا يؤدي إلى انتشار الأبواغ الموجودة في هذه الأوساط، والقضاء عليها في أثناء تعريضها للبخار في اليوم التالي، إذ إنه من المعروف أن درجة حرارة البخار والبالغة 100°م تقتل الخلايا الإعاشية فقط، وتُبقى على الأبواغ .

ملاحظة : إن غلي الأدوات بالماء بدرجة مئة لا يعتبر تعقيماً وخاصة لبضعة دقائق، وإنما هو تطهير. فالتعقيم بالغليان يحتاج إلى ساعتين على الأقل ولاسيما أن بعض الفيروسات وخاصة الفيروس الذي يسبب داء الإنتان

الكبدى لا يتلف بحرارة الغليان، وينتقل بالحَقْن غير المعقمة ويسبب الإنتان الكبدى الذي يسمى بأمراض الحقن .

ج- التعقيم بالتسخين المتقطع بدرجة أقل من مئة أو 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 بشكل يعلو فيه مستوى الماء الساخن مستوى السائل الموجود في الزجاجاة والمراد تعقيمه.

يمكن أن تُجرى عملية البسترة لمرة واحدة أو لعدة مرات 3- 8 يفصل بين كل مرة مدة 24 ساعة من الحضان، أي تتم العملية خلال 3 - 8 أيام متتالية، وذلك حسب المادة المراد تعقيمها . فعلى سبيل المثال يسخن المصل الدموي بدرجة حرارة 56°م ويعاد تسخينه سبع مرات بفواصل يوم واحد من الحضان بين المرة والأخرى. أما المواد الغذائية (لبن - حليب) والمراد حفظها لمدة مؤقتة، فتعقم بدرجة حرارة 75°م أو 85°م لمرة واحدة. وذلك 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 لمرة واحدة بعد التسخين مباشرة، فهذا من شأنه إحداث صدمة للأبواغ ومن ثم يقتل منها قسماً لا بأس به .

د- التعقيم باستعمال الحرارة الرطبة مع مادة قاتلة للجراثيم: تعتمد هذه الطريقة على التأثير الكبير للحرارة المرتفعة، وبوجود مادة كيميائية قاتلة للجراثيم، حيث يكفي تسخين السائل حتى 100°م ولمدة 30 دقيقة، أما المواد

الكيميائية القاتلة للجراثيم فهي عديدة مثل كلور الزئبق $HgCl_2$ - الفورم
الأدهيد - الفينولات - أملاح الزئبق - الفينيل . بتركيز 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 زراعة الجراثيم ، وإنما يمكن استعمال الحرارة بوجود حمض
أو قلوي بحيث لا يؤثر على نمو الجراثيم . وكثيراً ما تستخدم هذه الطريقة
لتعقيم علب الفواكه في الصناعات الغذائية حيث تكون درجة pH دون الـ
4.5.

3- التعقيم بالأشعة تحت الحمراء Infra Red :

تستعمل الحرارة الصادرة عن الأشعة تحت الحمراء في تعقيم
الأدوات الصغيرة مثل إبر التلقيح والماصات، حيث تمرر هذه الأدوات داخل
أنبوبة تحوي سلسلة من الوحدات الحرارية، ويضبط الجهاز بحيث يتم التعقيم
خلال 15 دقيقة على درجة حرارة $180^{\circ}C$ ، 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.Hz) للتعقيم والبسترة والتجفيف. وتكمن أهمية هذه الأمواج
بسرعة تسخينها للوسط، وبذلك فهي تحمل الحرارة بسرعة مهولة إلى جميع
أجزاء المادة المراد تعقيمها . وخلال زمن قصير تستطيع كميات كبيرة من
الطاقة أن تتحول إلى حرارة بحيث يقصر زمن التعقيم بالمقارنة مع الزمن
اللازم لوسائل التعقيم الأخرى .

ثانياً : التعقيم بالأشعة :

1-الأشعة ذات الأمواج القصيرة (غاما δ -X) :

وهي أشعة مؤينة أو مشردة Ionization لبعض المكونات الخلوية بسبب قصر موجتها (أشعة X من $100 - 10^{\circ} \text{A}$ ، وأشعة غاما δ من $0.01 - 10^{\circ} \text{A}$) واحتوائها على طاقة عالية تؤدي إلى نفوذها الشديد داخل الخلية الجرثومية، فتمنع تركيب DNA وتسبب تراكم RNA في السيتوبلازما وتوقف الانقسام الخلوي، وتعد جراثيم *Pseudomonas* أكثر الأنواع الجرثومية تأثراً بهذه الأشعة ، بينما تعد جراثيم *Clostridium* أقلها تأثراً . أما بالنسبة للأبواغ Spores والفيروسات فإنها تتأثر أيضاً على أن تكون كمية الأشعة التي تتعرض لها كبيرة .

2- الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet :

تستعمل الأشعة فوق البنفسجية بشكل خاص لتعقيم المياه والهواء وذلك بسبب عدم قدرتها على النفوذ داخل الأجسام الصلبة. إن طول الموجة الضوئية لهذه الأشعة ذات التأثير البيولوجي يتراوح بين $(2500 - 2800^{\circ} \text{A})$ ويعد كافياً لقتل الجراثيم؛ لأنه يؤثر في الأحماض النووية بشكل خاص، وإن أفضل طول موجة لقتل الجراثيم هو (253.7 نانومتر) ولكن هذه الأمواج لا تستطيع النفوذ إلا في الماء الصافي، ومن هنا يأتي عدم استعمالها الواسع في التعقيم، ويقتصر استخدامها على تعقيم السطوح فقط .

ومما تجدر الإشارة إليه أن للأشعة فوق البنفسجية تأثيراً ضاراً بل وخطيراً أحياناً بالعيون، لذلك يجب على العامل أن يضع نظارات خاصة أو أن يطفئ هذه الأشعة في أثناء وجوده في المختبر .

3- الأشعة الالكترونية Electronic Radiations :

تستعمل لذلك أجهزة خاصة تعتمد على إصدار الالكترونات من منبع ما .
ثم تسريع هذه الالكترونات ضمن حقل كهربائي مفرغ من الهواء ، مما يجعلها تملك القدرة على التعقيم تماماً كأشعة غاما δ إلا أنها أقل نفوذاً منها.
لكن المحذور 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 بمراكز خاصة بالدراسات النووية أو بمستشفيات كبيرة.

5- الضوء :

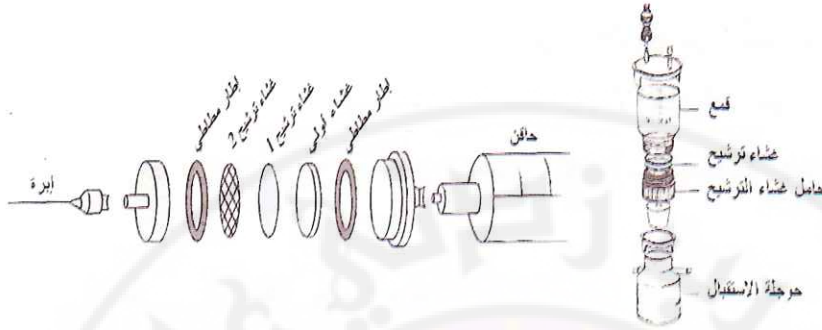
إن الظلام ضروري لنمو بعض الجراثيم، ويمكن استخدام هذه الخاصية لقتل بعض الجراثيم، فعلى سبيل المثال العصيات التيفية تتلف بتعرضها للضوء مدة 4 ساعات .

ثالثاً : التعقيم بالترشيح :

يستعمل الترشيح لتعقيم السوائل التي قد تتغير صفاتها عند تعقيمها بالحرارة ، أي يستخدم لتعقيم المواد السائلة الحساسة لدرجات الحرارة العالية كالدم وبعض السكاكر والفيتامينات، إذ تقوم المرشحات بإيقاف الجراثيم والتخلص منها بطريقتين :

- الطريقة الأولى ميكانيكية : تعتمد مبدأ الغربلة، وتتوقف على قطر الثقوب الدقيقة لهذه المرشحات .
- الطريقة الثانية كهربائية : تتضمن امتزاز الجراثيم نتيجة الاختلاف في الشحنات الكهربائية لكل من الفلتر والخلايا الجرثومية .

كما يمكن أن نستخدم لعزل الجراثيم من عينة ما .
والمرشحات تكون بأشكال مختلفة : (الشكل 34)



الشكل 34: بعض أشكال المرشحات

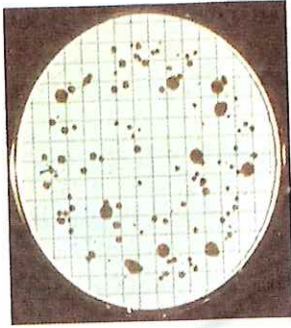
1- أغشية الترشيح :

عبارة عن أغشية صناعية ذات مسامات مختلفة الأقطار تتراوح بين (14-0.1) ميكرون. تصلح لتعقيم المواد الغذائية بكفاءة عالية . كما أنها تستخدم لعزل الجراثيم من عينة سائلة يراد اختبار وعدّ محتواها الجرثومي كما هو موضح بـ (الشكل 35- 36) . وهي تستخدم بكثرة في التحاليل الميكروبيولوجية للماء والسوائل سواء كانت أغذية أو غير ذلك.



الشكل 35

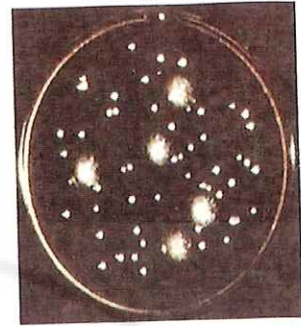
يوضح الشكل إمكانية استعمال أغشية الترشيح بثقوب مختلفة لعزل الأحياء الدقيقة من العينات السائلة ،
ويختلف زمن الحضانة على الأغشية باختلاف الوسط والأحياء الدقيقة



(a)



(b)



(c)

الشكل 36

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

2- أقراص الترشيح :

هي أقراص مصنعة من الأميانت أو الزجاج أو مواد أخرى . من أمثلتها مرشح Seitz filter .

3 - أسطوانات الترشيح (الشمعات) :

هي أسطوانات مصنعة من البورسلين أو من أغلفة المشطورات أو من مواد أخرى. من أمثلتها مرشح شامبرلند Chamberland filter ومرشح بيركفلد Berkefeld filter .

وفي جميع الحالات السابقة يجب أن تكون المرشحات معقمة 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 لأكثر من مرة. أما الأغشية الدقيقة وبعض الأقراص فتستعمل عادة لمرة واحدة فقط، ويفضل 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، لا تقبل الترشيح . ومن أهم الغازات السائدة :

1-أوكسيد الإيثيلين C_2H_4O : أو مشتقاته كالكربوكسيد Carboxyd الذي يستعمل لتعقيم المواد البلاستيكية والمطاطية التي تتخرب بالحرارة. مثال أنابيب البولي إيثيلين والأجهزة الالكترونية الطبية والسرنگات وأيضاً يستخدم في تعقيم القلب والرئة الاصطناعية . أما تأثيره فبطيء ويحتاج على الأقل ثلاث ساعات لقتل الأبواغ .

وهو عديم اللون ذو رائحة تشبه الكلوروفورم ، ينحل في الماء والمذيبات العضوية . يُعدُّ ضاراً بالجراثيم وخاصة الكبريتية منها ، لأنه يثبط عدداً من التفاعلات الإنزيمية في الخلية كما أنه يقتل الجراثيم والأبواغ والفيروسات والفطريات وعصيات السل .

ولكن استخدامه يتطلب تجهيزات واحتياطات خاصة ، فغاز الإيثيلين قابل للاشتعال بتركيز 3 %، ولكن مزيج من أوكسيد الإيثيلين و CO_2 بنسبة 10 % و 90 % على التوالي، يزيل خطر الاشتعال أو الانفجار. ويجب عند استعماله استخدام تهوية جيدة لإزالة البقايا منه تجنباً لأعراضه السمية .

2- أوكسيد البروبيلين $CH_2-CH-CH_2-O$: يستعمل أحياناً عوضاً عن أوكسيد الإيثيلين، وذلك لتأثيره القاتل على عدد كبير من الجراثيم حتى بتركيز 1 مل/ 1 ليتر علماً بأن قدرته على دخول الخلايا ضعيفة جداً .

3- الفورم ألدهيد : يستعمل لقتل الجراثيم وأبواغها على أن نأخذ بعين الاعتبار مدة التعقيم وتركيز الغاز. ويفضل 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 . ويجب الأخذ بعين الاعتبار أنه عندما يجري تعقيم مواد وأجهزة طبية يستحسن أن يكون التعقيم تحت التفريغ .

4- الأوزون O_3 : يتميز بلون أزرق ورائحة خاصة وتأثيره التعقيمي يكون أكبر عند توافر الرطوبة والحرارة المرتفعتين . وعندما يكون بتركيز 3 أجزاء في المليون يقتل الفيروسات في الماء خلال 4 دقائق ، أما بتركيز جزء في المليون فيقتل الخلايا الجرثومية خلال ساعتين. كما يستطيع القضاء على العديد من الأبواغ الجرثومية، لذلك فهو يستخدم في تعقيم مياه المجاري وتنقية مياه الشرب. وتجدر الإشارة إلى أن 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 أوكسيد الإيثيلين بنحو 4000 مرة. وهو غير قابل للاشتعال ولا للانفجار . يستعمل بكثرة في تعقيم الأدوات الجراحية والأوساط الغذائية وتطهير غرف العمليات .

خامساً : التعقيم الكيميائي :

تستخدم المطهرات Disinfectants كالكلوروفورم في تطهير الأيدي والمناضد وغيرها، وكذلك في تعقيم بعض المواد مثل المصول المستخدمة في تحضير الأوساط الغذائية حيث يضاف بنسبة 0.25 للأوساط ثم يتم التخلص منه بتسخينه على حمام مائي 55°م حتى يتطاير جميع الكلوروفورم .

ويستعمل بعضها مثل الفينول والكريزول بتركيز 5 % لتعقيم الأدوات الجراحية . وعموماً فإن هذه المواد تقتل الجراثيم، ولكنها لا تؤثر في الأبواغ الجرثومية .

ومن أهم المطهرات المستخدمة إضافة للمواد السابقة، الماء الأوكسجيني - كلور الزئبق - مركبات الأمونيوم الرباعية NH_4^+ - بعض الملونات كالبورات البنفسجية وأخضر الميتيل - الكحولات - الألدهيدات . هذا وسنستعرض أهم المطهرات في فصل خاص .
ومن الجدير بالذكر أنه ثمة مواد تمنع نمو الجراثيم دون أن تقتلها كما هو الحال في بعض المنظفات المنزلية .

الفصل الخامس

المُطهِّرات

DISINFECTANTS

تعريفها :

المطهرات (المعقمات) هي مواد كيميائية قاتلة للجراثيم تستخدم في التعقيم والتطهير والمداواة، ويكون استعمالها خارجياً بسبب أن سميته لا نوعية، فهي لا تؤثر فقط في الجراثيم، وإنما أيضاً في خلايا العضوية، وهي تستخدم للقضاء على الكائنات الدقيقة الحية والحد من انتشارها ولا سيما في البيئة المحيطة بمكان العمل أو على سطح الجلد، ولا يمكن استعمالها داخلياً بسبب سميته وعدم فعاليتها في النسيج. كما تشمل المطهرات المواد الكيميائية المعدة لتعقيم الأدوات والأجهزة الطبية .

آلية تأثيرها :

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

1- بعضها يؤثر بتراكيزه العالية في بروتينات الخلية الجرثومية، ويؤدي إلى ترسب هذه البروتينات أو مسخها وبالنتيجة قتل الخلية الجرثومية.

2- بعضها يتراكم على سطح الخلية الجرثومية ويبدل الخواص الفيزيائية والكيميائية للجدار الخلوي ومن ثم يؤدي إلى تصدع هذا الجدار وموت الخلية الجرثومية .

3- بعضها يمكن أن يؤثر بالأكسدة، أو يتحد مع جذر الكبريت
للإنزيمات الجرثومية، ويؤدي إلى اضطراب استقلاب الخلية
الجرثومية وموتها.

4- بعضها يؤثر في التوتر السطحي للغشاء الهولي للخلية
الجرثومية، ويؤدي إلى اضطراب في نفوذية هذا الغشاء.

وهناك عدة عوامل تؤثر في فعالية هذه المواد منها :

- 1- تركيزها في الوسط ، فحسب تركيزها يمكن لفعالها أن يكون
مبيداً أو كابحاً للجراثيم .
- 2- تماسها مع الجرثوم .
- 3- درجة الحرارة .
- 4- درجة انحلال هذه المواد .
- 5- نوع الجرثوم .
- 6- درجة الـ pH .
- 7- وجود البروتينات والصوابين والشوارد في الوسط .

ونظراً لذلك فإن تقدير فعالية هذه المواد يعد أمراً معقداً .

أنواع المطهرات :

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

1- الهالوجينات :

- اليود Iode : يعد اليود حتى يومنا هذا من أفضل المطهرات بسبب
رخص ثمنه وسميته القليلة للأنسجة، وفعالته على معظم الجراثيم
والفيروسات والحيوانات الأولية، ويستعمل بشكل صبغة اليود أو محلول

لوغول أو محلول اليود الغولي أو بشكل بوفيدون إيودين وهو مركب حامل لليود يحرره عند الاستعمال بشكل مستمر مما يزيد من انحلاله وفعاليته .

- الكلور **Chlore** : يعد مبيداً لمعظم الجراثيم باستثناء العصيات السلية، وهو يؤثر بالأكسدة من جهة وبالاتحاد بالبروتينات الجرثومية وتخریبها، يستعمل لتعقيم المياه ولا يستخدم 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- الأدهيدات **Aldahydes** :

إن العديد من الأدهيدات لها قدرة مبيدة للجراثيم فهي سامة بتركيزها الخفيفة، ومرسبة للبروتينات بتركيزها المرتفعة، وهي تؤثر ذات التأثير على خلايا العضوية والكائنات الحية الدقيقة .

- الفورمول **Formaldahyde** : وهو فعال في الجراثيم والفطور والفيروسات، ولكن تأثيره بطيء ، فمحلول 0.5 % منه يقتل الجراثيم خلال 6 - 12 ساعة بينما يحتاج إلى 2 - 4 أيام لقتل الأبواغ ، وإن محلول 8 % منه يحتاج إلى 18 ساعة لقتل الأبواغ .

وتستعمل محاليل الفورمول 2-8 % كمبيدة للجراثيم. أما محلول الفورمول 8 % في الغول الإيزوبروبيلي 70 % فيستخدم للقضاء على عصيات السل في القشع. ويستخدم الفورمول لحفظ العينات النسيجية والجثث، ويستخدم أيضاً في تحضير اللقاحات كتحضير الذايفانات المعطلة المستخدمة في اللقاح كذايفان الكزاز وذايفان الوتدية الخناقية، أو قتل الجراثيم والفيروسات لاستخدامها في اللقاح .

لا يستخدم الفورمول في المعالجة الطبية بسبب سمّيته وترسيبه للبروتينات .
- الغلوتار الدهيد **Glutaraldehyde** : وهو أكثر فعالية من الفورمول وأقل تطايراً ورائحته أقل تخريشاً ، وتستخدم محاليله القلوية 2 % في الغول الإيزوبروبيلي 75 % التي تكون قاتلة للأبواغ خلال 10 ساعات لتعقيم المعدات الطبية وخاصة أدوات التنظير .

3- الكحولات **Alcools** :

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

- الإيثانول **Ethanol** : تختلف فعاليته حسب درجة تركيزه ، ويعد مبيداً لمعظم الجراثيم الممرضة، وذلك بتركيزه الملائمة، ومع ذلك تبقى بعض الأنواع الجرثومية حية في تراكيزه المثلى، وهو غير فعال في الأبواغ والفطور و الفيروسات .

ويعد الإيثانول 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 الإيثانول من مرسبات البروتينات ، لذلك وضعه على الجلد لفترة طويلة قد يؤدي لتهيجه ، كما أنه لا يستعمل لتطهير الجروح العميقة؛ لأنه يزيد الحالة سوءاً بترسيبه للبروتينات ، وقد يشكل جلطة تحتمي بها الجراثيم وتتكاثر في طياتها .

- الإيزوبروبانول **Isopropanol** : يستعمل بتركيز 70 % مبيداً للجراثيم وهو فعال في التراكيز الأعلى من ذلك ، لذلك فهو يستخدم كسواغ للمطهرات الأخرى حيث يزيد من فعاليتها .

4- الفينول ومشتقاته Phenol :

- الفينول (حمض الكاربوليك Carbolic acid) : تأثيره مبيد للجراثيم بمسحه للبروتينات ، ولكن استعماله محدود بسبب رائحته وسميته الشديدة ، لذلك تستعمل مشتقاته عوضاً عنه. كما أنه يفقد فعاليته في الأوساط القلوية وبخاصة عند إضافته للصابون .

- الكريزول Cresol : هو من مشتقات الفينول، له تأثير مبيد لمعظم الجراثيم الممرضة بما فيها المتفطرات *Mycobacterium* بأنواعها ، ولكنه سام جداً ، ويستخدم بتركيز منخفضة مع صابون بزر الكتان مطهراً ومعقماً للأدوات الطبية .

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

- الهكزاكلوروفين Hexachlorophene : فعال في الجراثيم إيجابية غرام وخاصة المكورات العنقودية ، فهو يقتلها بتركيز 3 % بمدة 15 - 30 ثانية، أما الجراثيم سالبة غرام فتحتاج إلى 24 ساعة كي تموت به، ولكن بعضها يمكن أن تقاومه، وتتكاثر بداخله، فتشكل أوبئة في المشافي عند استخدامه للتطهير. يستخدم بشكل جيد للتعقيم من قبل الجراحين والمرضات وأطباء الأسنان، لأنه ضعيف السمية، ولأن معظم الجراثيم الموجودة على الجلد هي إيجابية غرام .

4- الحموض Acids :

استعملت قديماً مادةً حافظة للأغذية، ويستخدم بعضها الآن مادةً مطهرة وكأدوية، أما تأثيرها فيعود إلى زيادة تركيز شوارد الهيدروجين في الوسط.

- **حمض الخل Acetic acid** : تعد محاليل هذا الحمض بتركيز 5 % مبيدة للجراثيم، وبتركيز أقل من ذلك كابحة للجراثيم، أما محاليله بتركيز 1 % فتستخدم من قبل الجراحين لتعقيم الجلد والجروح ، كما تستخدم لمعالجة أخماج الجروح المصابة بالعصيات الزرقاء ، فهي حساسة له وأيضاً المشعرة المهبلية والمستدميات وفطور المبيضات البيض تُعد حساسة لهذا الحمض بتركيز 1 %.

- **حمض البنزويك Benzoic acid** : استخدم هذا الحمض بتركيز 0.1 % في حفظ الأغذية لمنع تكاثر الفطور والجراثيم شرط أن يكون الوسط حمضياً خفيفاً، أما بالوسط القلوي فتتناقص فعاليته، وهو حمض لا طعم له ولا لون وعديم السمية باستثناء بعض الحالات التي قد تسبب تهيج المعدة .

- **حمض البوريك Boric acid** : يعد كابحاً للجراثيم، استخدم قديماً لمعالجة التهاب القرنية، لكنه ينطرح سريعاً مع الدمع لذلك تأثيره محدود، لا يستخدم لتعقيم الجروح فقد ثبتت سميته المميتة نتيجة امتصاصه من قبل الجرح وخاصة عند الأطفال .

- **حمض اللاكتيك Lactic acid** : يستخدم محلوله بتركيز 10.5 % مطهراً خفيفاً للجلد وخاصة للولدان ، ولكنه قد يحرض الجلد إذا تكرر استعماله .

6- الأملاح المعدنية :

- **أملاح الزئبق** : هي كابحة للجراثيم وغير فعالة في الأبواغ ، أهمها كلور الزئبق، ولكنه لم يعد يستعمل حالياً بسبب سميته ، أما أملاحه العضوية فتعد أكثر فاعلية وأقل سمية ، ومنها الميكروكروم الذي حظي بأهمية كبيرة سابقاً، ولكن انحصر استعماله الآن بسبب سميته. أما أملاح فينيل الزئبق فتستخدم في المستحضرات الصيدلانية العينية ومستحضرات التجميل كمثبطات

للجراثيم إيجابية غرام وسلبية غرام وعصيات القيقح الأزرق والפטور والخمائر والطحالب .

- **أملاح الفضة** : تعد مبيدة للجراثيم بسبب تحريرها لكميات كبيرة من شوارد الفضة التي ترتبط ببعض الجذور الكيميائية مثل السلفدريل والكاربوكسيل والفوسفات فتبدل من خواص البروتينات وترسبها مما يؤدي إلى ظهور تأثيرات مهيجة وكاوية للجلد، لذلك لم تستخدم عملياً لتطهير الجلد. أهم أملاحه المستخدمة نترات الفضة التي تستخدم كأملح كاوية حيث يمكن استخدامه للمعالجة الموضعية للجلد المصاب بقرحات الداء القلاعي، فهو بتركيز 0.1 % يعد مبيداً للجراثيم وبتركيز أدنى من ذلك يعد كابحاً لها أما أملاحه العضوية فهي منحلة قليلاً ولا تحرر شوارد كثيرة من الفضة لذلك تعد مطهرات جيدة لأنها لا تؤثر في الأنسجة وتؤثر في الجدار الخلوي والغشاء السيتوبلازمي للخلية الجرثومية .

7- المؤكسدات :

إن بعض المطهرات تكون سامة للجراثيم بسبب أن لها القدرة على أكسبتها، ومن أهم هذه المؤكسدات :

- **الماء الأوكسجيني** : إن محلول الماء الأوكسجيني 3 % في الماء يعدّ من المطهرات الخفيفة التي تستخدم لتطهير الجلد، ولكن وجود إنزيم الكاتالاز في الأنسجة يفكك الماء الأوكسجيني ويطلق الأوكسجين بسرعة ويبطل فعاليته . وإن فعاليته تعود لقدرته على تشكيل جذر الهيدروكسيل. يستخدم كمطهر للأدوات الجراحية والعدسات العينية اللاصقة .

- **بنزويل بيروكسيد** : هو مبيد للجراثيم بسبب تحريره البطئ للأوكسجين، يؤثر في الجراثيم اللاهوائية والمحبة لكميات قليلة من الهواء .

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

8- الملونات :

لا يقتصر عمل بعض الملونات على التلوين فقط، وإنما يمكن أن تكون هذه الملونات قاتلة للخلايا الجرثومية وخاصة بالنسبة للملونات الأساسية، فهذه الملونات لها ألفة خاصة نحو المجموعة الفوسفاتية الحامضة للبروتينات النووية أو بعض مكونات الخلية الجرثومية. ومن أهم هذه الملونات :

- مشتقات التري فينيل ميثان **Triphenylmethan** : وأهمها بنفسجية الجانسيان (البلورات البنفسجية Violet crystal) التي تؤثر كمبيدة للجراثيم أو كابحة لها بتنشيطها لتصنيع الجدار الخلوي وخاصة للجراثيم إيجابية غرام وبعض الفطور أما الجراثيم سلبية الغرام والجراثيم المقاومة للحمض والغول فإنها شديدة المقاومة لهذا الملون. ومن هنا أتت أهمية هذا الملون في علم الجراثيم إذ أن إضافته للأوساط الزرعية للجراثيم تعطي الوسط صفة الاصطفائية لتنمية الجراثيم سالبة الغرام فقط دون السماح للجراثيم موجبة الغرام بالنمو وبذلك يتم عزل الجراثيم سالبة الغرام عن باقي الجراثيم .

تستخدم محاليل البلورات البنفسجية بنسبة تتراوح ما بين 0.02 % وحتى 0.1 % لمعالجة الأخماج الفقيحية، ولكن من سيئاتها أنها تصبغ الجلد بلون بنفسي .

وأيضاً من مشتقات التري فينيل ميتان نذكر ملون الخضرة الالامعة (أخضر المالاكيت) ولكن استعماله محدودة .

- مشتقات الأكردين **Acridin** : هي ملونات صفراء تثبط اصطناع الحموض النووية والبروتينات في الخلايا الجرثومية وخلايا الثدييات، وتعدّ مبيدة للجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام وأيضاً تؤثر على الفطريات والمشعرة المهبليّة .

- ملونات أخرى: مثل الإيوزين (Eosine) بمحلوله المائي 2 % الذي يعد من المطهرات الجيدة ، وأيضاً أزرق الميتلين .

9- العوامل الفعالة في التوتر السطحي :

تستعمل هذه المركبات على نطاق واسع في المنازل أو في الصناعة كالمنظفات، وإن بعضها له القدرة على ترسيب البروتينات أو مسخها والقضاء على الكائنات الحية الدقيقة. ومن أهم هذه المركبات :

- **العوامل الهابطة:** وأهمها مركبات الأمونيوم الرباعية التي تؤثر في نفوذية الغشاء الهولي للجراثيم، وإن فعالية هذه المواد تزداد في الأوساط القلوية وتعد مبيدة للعديد من الجراثيم وخاصة إيجابية الغرام، وتقل فعالية هذه المواد بوجود المواد الدهنية في الوسط مثل القيق وكذلك وجود الصوابين وبعض العوامل الصاعدة يقلل من فعاليتها، وهي غير فعالة في الأبوغ .

- **العوامل الصاعدة:** من أهمها الصابون والحموض الدسمة ولوريل سلفات الصوديوم **Lauryl sodium sulfate** التي تنفك لتوليد الشوارد السلبية، وهذه المواد فعالة في الأوساط الحامضية وتؤثر بخاصة على الجراثيم إيجابية الغرام . وتزداد فعاليتها بمشاركتها مع الحموض إذ تبديد معظم الجراثيم خلال 30 ثانية، تستخدم لتطهير الأدوات والأجهزة المعدة للصناعات الغذائية. وإن

فعالية هذه المواد تعود إلى تأثيرها المفكك للبروتينات الشحمية الموجودة في الغشاء الهولي مما يحرض الإنزيمات الحالة على حل الخلية الجرثومية. إن وجود العوامل الهابطة مع العوامل الصاعدة معاً يؤدي إلى تعديل فعالية كل منهما وإبطال تأثيرهما.

- **العوامل اللاشاردية :** هي عوامل ذات تأثير ضعيف على الجراثيم ولها استخدامات عديدة، منها التوين 80 (Tween 80) الذي يستخدم كمحرض لنمو العصيات السلية، ومنها (Triton-x-100) التريتون 100 x الذي يحل الغشاء الهولي ويسهل استخلاص بروتينات الجدار الخلوي والغشاء الهولي.

10- مطهرات متفرقة :

- **الكلورهيكزدين :** فعال في الجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام بتخريبه للغشاء الهولي للخلية الجرثومية، ويستخدم كمطهر للجروح بنسبة 1-4 % كما يستخدم لمعالجة تسوس الأسنان ووقايتها ومعالجة التقرحات القلاعية .

- **النتروفورازون :** فعال في الجراثيم إيجابية الغرام وسلبية الغرام ، يستعمل بتركيز 0.2 % وسميته قليلة كما أنه لا يمتص من المخاطيات و الحروق.

- **الأسيتون :** يعد مبيداً للجراثيم والفيروسات ولكنه غير فعال في الأبواغ، وهو فعال جداً بشكله النقي فهو يقتل الجراثيم خلال 5-30 ثانية وقليل الفعالية بتركيز أقل من 40 % ، لكنه سريع التبخر مما يفقده الكثير من فعاليته مقارنة بالكحول، ويعتبر مزيجاً من الغول مع الأسيتون من أفضل المطهرات.

- **أوكسيد الإيتلين :** يعد من العوامل المؤلفة المبيدة للجراثيم والمستخدم على نطاق واسع للتعقيم الغازي . (راجع بحث التعقيم) .

الفصل السادس

أوساط الاستنبات CultureMedia

تعريف أوساط الاستنبات :

هي الأوساط التي تستطيع الجراثيم 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 لاختلاف هذه المتطلبات من مجموعة إلى أخرى تبعاً لخصائصها الفيزيولوجية والبيئية وقدراتها الاستقلالية فإنه من البدهي أن نجد اختلافات مقابلة في تركيب هذه الأوساط وطبيعتها الفيزيائية والكيميائية، وهكذا يمكننا أن نميز بين مجموعتين أساسيتين من الأوساط :

- الأوساط الحية **In - Vivo** : وتستخدم لتنمية الأحياء غيرية التغذية الإلجبارية التطفل مثل الفيروسات - الركتسيا - الكلاميديا (المتدثرات) من هذه الأوساط مثلاً بيض الدجاج - قطع الكبد - الجراثيم - خصية الأرنب .

- الأوساط المخبرية الصناعية **In - Vitro** : وتعني الأوساط التي نركبها في المختبر من مواد طبيعية أو صناعية ونضعها في الزجاج تمهيداً لاستخدامها ، أي الزرع في الزجاج .

لكن تباين المتطلبات الغذائية والأنماط الاستقلالية والبيئية يقودنا إلى تنوع حتمي أكبر في الأوساط لتلبية حاجات المجموعات التصنيفية على

مستوى الفصيلة والجنس وحتى النوع والسلالات المختلفة داخل النوع الواحد.

وهذا ما يجعل الأوساط المستخدمة عملياً متعددة جداً بالرغم من أن معظمها لايزيد عن كونه وليد تعديل طفيف أو كبير لأوساط أساسية عامة بغرض جعلها أكثر ملاءمة لتلبية حاجات الأنواع المختلفة أو أكثر كفاءة في استنبات أنواع محددة وعزلها للحصول على مزارع نقية . وهذا يعني أن استخدام وسط معين دون غيره يتوقف أيضاً على الغرض من الدراسة . ويمكن أن تكون الأوساط :

- **طبيعية Natural Media**: تتركب من مواد طبيعية معقدة التركيب مثل مرق اللحم- الدم الآغاري (الآغار المدمى)- الحليب - البطاطا.
- **صناعية Synthetic Media** : تتركب من مواد صناعية محددة التركيب والأوزان مثل وسط شابيك - وسط سيمون .
- **نصف صناعية أو نصف طبيعية Natural Synthetic Media**: يدخل بتركيبها مواد طبيعية ومواد صناعية مثل خلاصة الشعير المضاف لها بعض الأملاح اللاعضوية والسكريات .
- يمكن أن تكون الأوساط سائلة أو صلبة أو نصف صلبة وذلك تبعاً لهدف التجربة. ويجمد الوسط عادة بمادة الآغار آغار وهي مادة مستخرجة من بعض الطحالب مثل طحلب الجيليديوم *Gelidium* وتتكون من بروتينات سكرية ، ولا تستطيع معظم الجراثيم استقلابها والتغذي عليها (باستثناء بعض الأنواع الجرثومية) .
- ويكون الآغار صلباً (جامداً) في درجة حرارة 42°م فما دون ومصهوراً (مائعاً) في درجة حرارة 42°م فما فوق .

ويكفي إضافة 15 غ لكل 1 لتر من الوسط المغذي السائل لكي يصبح الوسط صلباً و 7 - 8 غ لكل 1 لتر ليكون نصف صلب. ولكن الأغار عندما يتصلب يطلق كمية من بخار الماء لذلك يجب عند زرع طبق بتري بالخلايا الجرثومية وضعها بالوضع المقلوب في الحاضنة كي لا يسيل عليها الماء ويمزج المستعمرات بعضها ببعض.

- ويمكن أن يجمد الوسط بمادة الجيلاتين ، 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 الجيلاتين وسطاً تفريقياً يفرق بين نوعين أو مجموعتين من الجراثيم، المجموعة الأولى محللة للجيلاتين والمجموعة الثانية غير محللة له حيث إنّ المجموعة الأولى تستطيع التغذي على الجيلاتين وتحليله وتحويله من الحالة الصلبة إلى الحالة السائلة حتى في درجات الحرارة المنخفضة دون الـ 25°م.

ملاحظة: الأطباق الحاوية على وسط الجيلاتين (الهلام) لا توضع بالشكل المقلوب في الحاضنة كي لا يسيل الجيلاتين إذا ما تحلل أو يسيل إذا كانت درجة حرارة الحضانة 37°م .

- ويمكن أن يجمد الوسط بمادة هلام السيليس .

ملاحظة: يجب أن يكون الوسط معقماً وموجوداً بأوانٍ معقمة .

الشروط الواجب توافرها 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 ثاني أكسيد الكربون الجوي أو من

مركبات كربونية عضوية أو لاعضوية .

3- مصدر للآزوت : إما من الآزوت الجوي أو من مصدر عضوي أو لاعضوي .

4- مصدر لعنصري الكبريت والفوسفور : قد يكون كبريت حر أو فوسفور حر أو أن يكون مصدرهما عضوي أو لاعضوي .

5- عناصر نادرة : مثل الصوديوم - الكوبالت - المغنيزيوم - المنغنيز - النحاس - التوتياء الخ وتستخدم بكميات زهيدة جداً ، وإن زيادتها أحياناً تكون مؤذية للجراثيم .

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

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

8- الشروط البيئية والفيزيائية: وتكون هذه الشروط ضرورية لنمو الجراثيم، بل هي عوامل نمو محددة قد تثبط هذا النمو كلياً أو جزئياً عندما لا تكون ملائمة. ومن هذه العوامل نذكر: درجة الحرارة - درجة الحموضة pH (التي تضبط بإضافة بعض المحاليل الموقية أو ما يسمى بالبرفر Buffer) - الضغط الحلولي - الأوكسجين - الإضاءة الخ. وأخيراً يجب أن يكون الوسط ملائماً للجراثيم نفسه . مثلاً :

- الجراثيم المخمرة للاكتوز يجب أن تزرع على وسط يحوي اللاكتوز .
- جراثيم التربة يجب أن تزرع على وسط مضاف له خلاصة التربة .
- جراثيم الحليب يجب أن تزرع على وسط مضاف له الحليب الخ .

أنواع أوساط الاستنبات :

سبق أن ذكرنا أن الأوساط الزرعية تتنوع بسبب اختلاف المتطلبات الغذائية للجراثيم ويمكن أن نصنف الأوساط الزرعية وفق الهدف من استعمالها إلى :

1- الأوساط الغنية : مثل وسط الدم الآغاري ووسط مرق اللحم. وتنمو على هذه الأوساط معظم الأنواع الجرثومية وتستخدم أيضاً لتنمية الجراثيم غيرية التغذية .

2- الأوساط المختارة : وهي أوساط مغذية أضيف إليها بعض المواد الخاصة؛ لتؤثر على نمو بعض الجراثيم مثل إضافة البلورات البنفسجية بتركيز معينة لتزيد من نمو الجراثيم سالبة الغرام وتحد من نمو الجراثيم موجبة الغرام .

3- الأوساط التفريقية: تساعد على التفريق بين نوعين من الجراثيم، إذ يضاف إليها بعض المواد لاختبار إمكانية تحليلها من قبل مجموعة من الجراثيم أو عدم تحليلها ، مثال إضافة الكازئين لمعرفة إذا ما كان الجرثوم محلاً له أو غير محلل، وكذلك إضافة الجيلاتين والدم و..... الخ .

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

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

6- أوساط تحدد صفات الجرثوم : وهي أوساط خاصة تستعمل لعزل الأنواع الجرثومية التي لها قدرة وظيفية ما، مثل الأوساط التي تحدد مجموعة جراثيم *Azotobacter* أو مجموعة جراثيم حلقة الكربون .

7- أوساط منظمة : تستعمل للحفاظ على الجراثيم واستمرارية نموها لزمان طويل، حيث تضاف بعض المواد التي تحفظ المستعمرات من الفناء، وتبقيها حية أكبر مدة ممكنة .

8- أوساط اصطفائية : ومميزة معاً وهي تصطفي نوعاً واحداً وتميزه من باقي الأنواع الجرثومية معتمدةً على خاصية معينة يملكها دون سواه ، مثال وسط E.M.B الذي يميز *E.coli* عن غيره من الجراثيم التي تنمو عليه.

الفصل السابع

تقانة الزراعة الطاهرة

وطرائق الاستنبات

إن استنبات الأحياء الدقيقة في مزارع نقية وعزل الأنواع المختلفة يتطلب تقنية خاصة وحذراً وحرصاً شديدين، وهو يقتضي قبل كل شيء تعقيم أوساط الاستنبات وإجراء عملية الزرع في شروط صارمة تمنع حدوث أي تلوث جانبي، ثم حفظ هذه المزارع في حالة نقية وإمكانية تلقيح أوساط مغذية جديدة بالمزارع النقية، على أن تجرى كافة العمليات أمام اللهب وتعقم إبرة الزرع باللهب قبل وبعد التلقيح، 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 وبعد عملية النقل أو التلقيح. 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 الزراعة الطاهرة أساسية جداً في جميع الدراسات الميكروبيولوجية يجب التدرب عليها وإتقانها قبل كل شيء آخر . كما ينبغي دائماً في أثناء عمليات الاستنبات ترك أنبوب اختبار (أو طبق بتري) دون تلقيح حيث يستخدم شاهداً ويدلنا في الوقت نفسه على كفاءة عملية التعقيم ودرجة إتقاننا لتقنية الزراعة الطاهرة .

المحاذير التي يجب ملاحظتها عند أخذ وزرع النماذج الجرثومية :

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

1- نظافة الأيدي وخاصة الأظفار التي يجب أن تكون قصيرة، مع ارتداء القفازات الخاصة لذلك .

2- يُغطى الشعر والأنف والفم ، عادة بقناع قماشي .

3- يجب أن يكون مكان العمل مغلقاً تماماً، وتتم تدفئة أو تهوية المكان بأجهزة خاصة، وأحياناً يضطر إلى تنظيف مكان العمل بأكمله بالفورمول أو أية مادة معقمة أخرى، وأحياناً يستخدم الهواء المعقم بأوراق ترشيح أو صفائح زجاجية خاصة ، أو نعقم المكان بمصابيح للأشعة فوق البنفسجية التي نوقفها عند بدء العمل خوفاً من قتل الجراثيم المراد دراستها من جهة ولكي لا تؤثر تأثيراً سلبياً في المخبري من جهة أخرى .

بعد الانتهاء من عملية الزرع توضع الجراثيم في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة ولزمن مناسب مع مراعاة ما يلي :

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

2- وضع الأنابيب على حامل الأنابيب وبشكل قائم .

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

يمكن التعرف على نوع الجرثوم بعد عمليتي العزل والزراعة السابقتين بإجراء ما يلي :

1- دراسة خصائص المستعمرات الظاهرية على الأوساط الزرعية المعروفة.

2- فحص الجراثيم وتلوينها لمعرفة شكل الجرثوم وتحديد نوعيته تلوينه .

3- دراسة متطلباته الغذائية .

4- دراسة خواصه البيوكيميائية (تخمر السكريات - إمالة الجيلاتين - إطلاق H_2S ) .

5- دراسة خواصه المصلية باستعمال المصول وتفاعل التراص . Agglutination

6- استخلاص DNA الجرثوم وتحديد هويته.

7- دراسة خواصه الممرضة على بعض الحيوانات أو النباتات .

وتجرى دراسة الخواص المصلية والممرضة في حال الدراسات الطبية بشكل خاص .

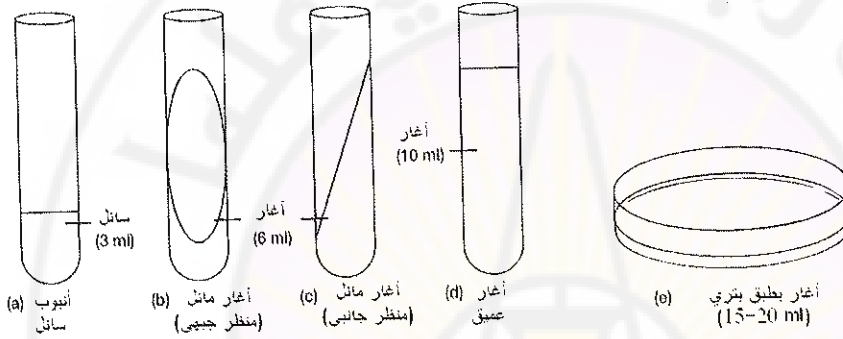
طرائق تحضير المزارع الجرثومية :

يطلق اسم المزرعة الجرثومية على النمو الحاصل عند استنبات الجراثيم على الأوساط الغذائية المختلفة. 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 طرق 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 37).

آ - المزارع السائلة التي تجرى عادةً 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 .



الشكل 37

أنماط المزارع الجرثومية

طرائق الاستنبات Bacterial cultures :

أولاً : الاستنبات في الأنابيب :

1- الاستنبات في وسط سائل Liquid culture :

تعدُّ هذه الطريقة من أبسط الطرق وتتضمن استنبات الجراثيم في أنابيب اختبار تحتوي على وسط مغذ مناسب (ماء + مواد مغذية) ويبدو نمو الجراثيم في مثل هذه الأوساط بأحد الأشكال الآتية :

عكر - تشكل غشاءً رقيقاً على السطح - ظهور ترسبات في قعر الأنبوب - حدوث لزوجة للوسط نتيجة إفراز مواد مخاطية- تكون غازاً ذائباً في الوسط نتيجة النمو.

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

2 - الاستنبات فوق سطح مائل من الوسط الصلب :

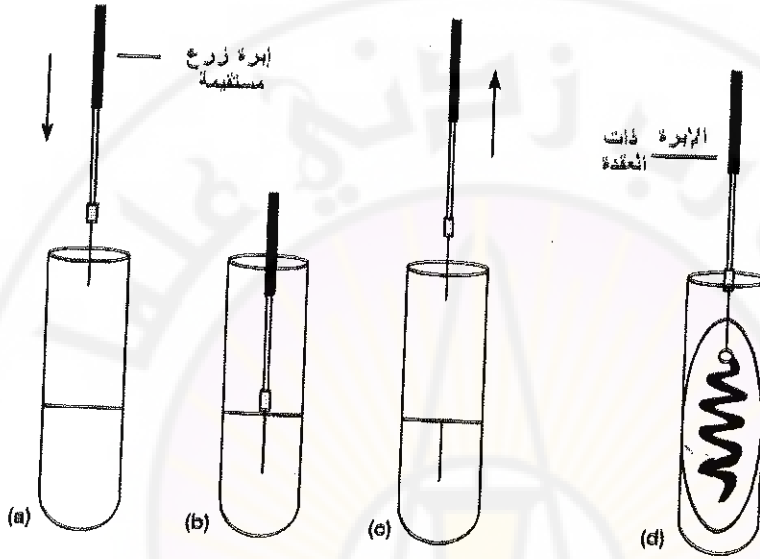
تدعى هذه الطريقة من الاستنبات بالآغار المائل Agar slope أو Slant وهي تتضمن الاستنبات في أنابيب اختبار حاوية على وسط مغذ مضافاً إليه الآغار ومبرداً في وضعية مائلة . وتعد هذه الطريقة مجدية نظراً لأن من شأنها زيادة السطح القابل للزراعة وسهولة تلقيح الأنابيب وملاءمتها لاستنبات الجراثيم الهوائية أو اللاهوائية المخيرة، بالإضافة لذلك فهي تمكننا من ملاحظة بعض خصائص المستعمرات الجرثومية كتشكيل 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 83).

3- الاستنبات في الآغار العميق :

وفيها 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 وبشكل

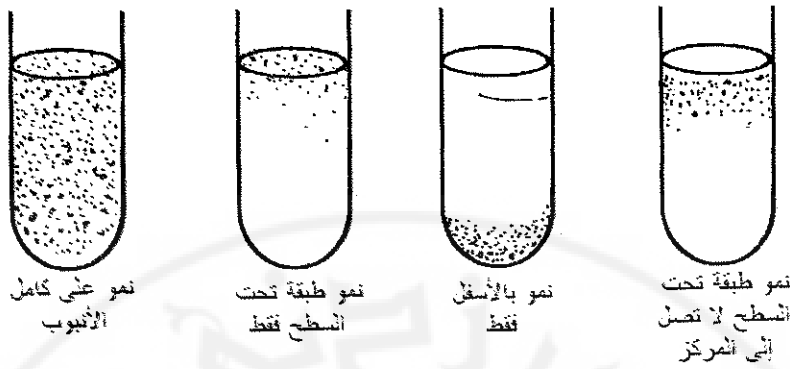
مستقيم داخل الوسط المغذي وتسحب أيضاً بشكل مستقيم بحيث لا تؤثر في تماسك الوسط المغذي (شكل 26) .



الشكل 83

رسم يوضح طريقتي الوخز والتخطيط في الأنبوب

- طريقة الهز (الرج) Shake : حيث يتم تحضير المزرعة بتلقيح الوسط الصلب داخل الأنبوب بعد تمييعه، ثم هز 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 بشكل خاص لمعرفة الاحتياجات الهوائية للجراثيم (شكل 39) .



الشكل 39

يوضح مناطق نمو الجراثيم في الآغار العميق حسب الاحتياجات الهوائية

ثانياً - الاستنبات في أطباق بيري Agar plates :

يجري الاستنبات في أطباق بيري الحاوية على وسط مغذ بثلاث طرق رئيسية. وهي طرائق جيدة للحصول على مستعمرات جرثومية معزولة بعضها عن بعض، هذه الطرائق هي :

1- طريقة التخطيط Streak plates فوق سطح من الوسط المجمد :

إن إضافة مادة مجمدة كالآغار لوسط البروث (السائل) تؤدي إلى تشكل وسط صلب ومن ثم فإن الخلايا الجرثومية التي تزرع في مثل هذا الوسط تتكاثر في مكانها لتشكل كتلة مرئية بالعين المجردة ندعوها بالمستعمرة Colony فكل خلية حية (أو مجموعة خلايا) تعطي عند استنباتها مستعمرة منفصلة مستقلة يمكن تمييزها وعزلها عن بقية المستعمرات، ونعتمد في ذلك على بعض الخصائص الشكلية لمستعمرات الأنواع المختلفة في وسط معين. (هذا وسنستعرض في نهاية طرق الاستنبات ، أشكال ومظاهر النمو المختلفة للجراثيم على مختلف البيئات الغذائية).

وتتضمن هذه الطريقة ثلاث خطوات متتالية هي :

الخطوة الأولى: صب الوسط المغذي في طبق بتري معقم مع أخذ

الاحتياطات اللازمة لمنع حدوث أي تلوث جانبي .

الخطوة الثانية : تعقيم إبرة التلقيح على اللهب بطريقة الإحماء .

الخطوة الثالثة: تلقيح الوسط المغذي بعد تجمده على سطحه بطريقة الخطوط

التي يمكن تنفيذها بعدة أشكال .

ويهدف التخطيط إلى تخفيف اللقاح إلى أقصى درجة ممكنة، وبهذا

يظهر النمو الجرثومي في نهاية الخطوط على شكل مستعمرات نقية مفردة

Single colonies مناسبة للعزل والدراسة. ويمكن تخطيط الأطباق الحاوية

على بيئة عزل مناسبة للحصول على مستعمرات منعزلة وفق مراحل العمل

الآتية :

1 - اقسام 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 (شكل 40) .

3- عَقِّمِ الإبرة وبردّها ثم أدِرْ الطبق وخطِّطْ في الاتجاه الثاني ابتداءً من

آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الأول .

4- عَقِّمِ الإبرة مرة أخرى وبردّها ثم أدِرْ الطبق وخطِّطْ في الاتجاه

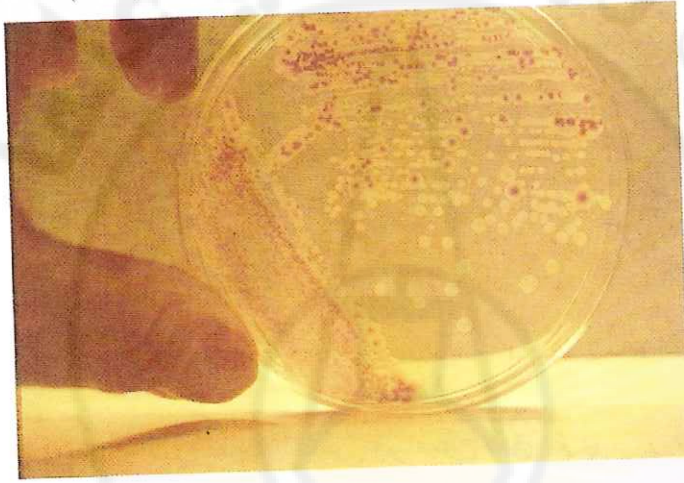
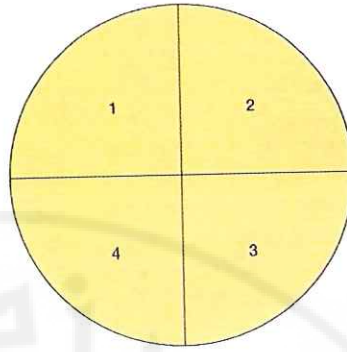
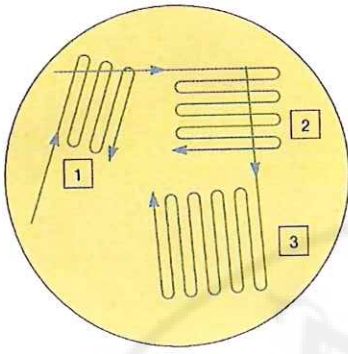
الثالث ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثاني .

5- عَقِّمِ الإبرة مرة أخرى وبردّها ثم أدِرْ الطبق وخطِّطْ في الاتجاه

الرابع ابتداءً من آخر خط وصلت إليه في الاتجاه الثالث .

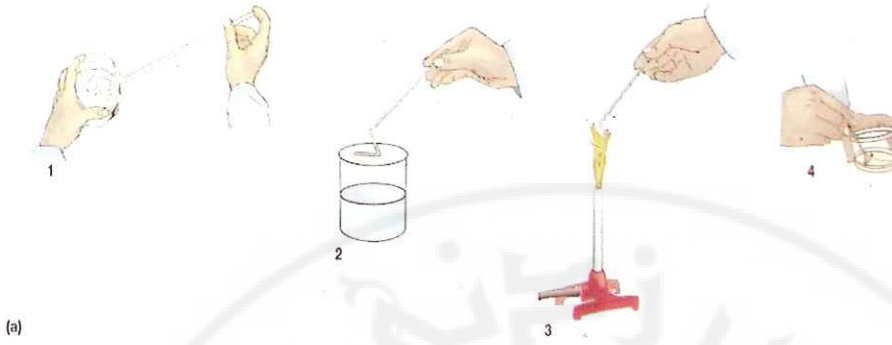
6 - احضن الطبق ، فتنمو عليه مستعمرات نموذجية كما في (الشكل

(40).



الشكل 40: رسم يوضح تخفيف اللقاح بطريقة التخطيط

1- طريقة النشر على سطح طبق بتري: وتستخدم للتحري عن محتوى عينة سائلة من الجراثيم وعدّ الجراثيم الموجودة داخل هذه العينة. وتتم بأخذ كمية معينة من العينة السائلة وفرشها على سطح طبق الآغار بالناشر (السباتيول)، المعقم إما بالحرارة الجافة بعد لفه (قبل إجراء التجربة)، أو بغمسه بالكحول (في أثناء العمل) ومن ثم تمريره على اللهب كما في (الشكل 41)، وبعد عملية الفرش يترك طبق بتري كي يجف ويمتص السائل الموجود على سطحه، ثم يحضن بالموضع المقلوب .



الشكل 41

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 الناشر في الكحول
- 3 - عقم الناشر 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 .

ج - طريقة الآغار المصبوب : المتضمنة توزيع الجراثيم المراد استنباتها في جميع أرجاء الوسط .

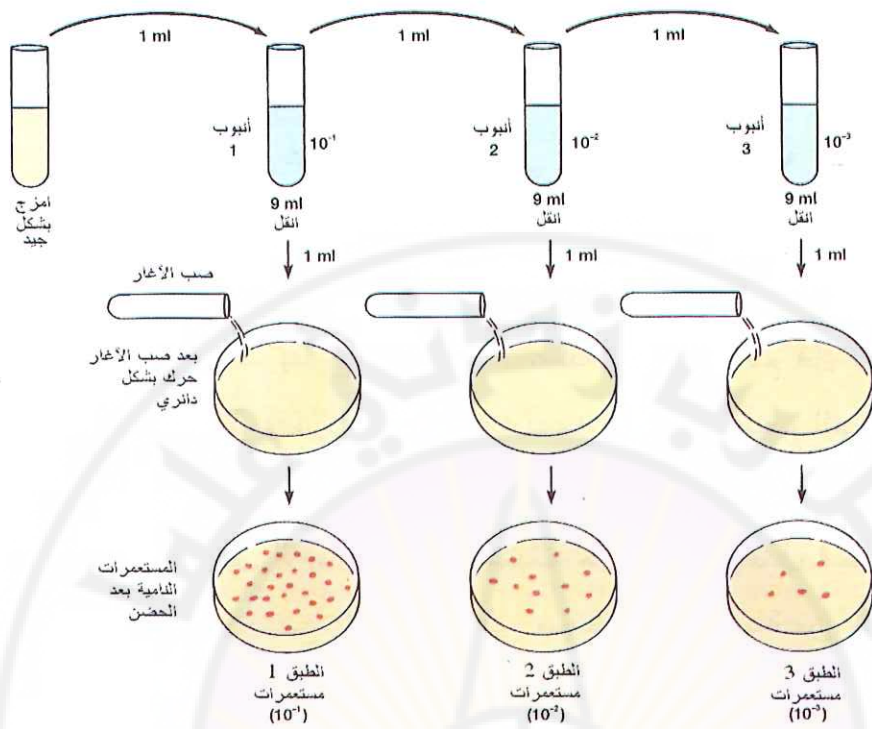
تعدُّ هذه الطريقة مفيدة للحصول على مستعمرات مستقلة ومن ثمَّ عزل الأنواع الجرثومية المختلفة الموجودة في خليط من الوسط الطبيعي أو البروث المغذي .

وتختلف عن الطريقة السابقة في أن عملية الاستنبات تتم قبل تجمد الوسط الآغاري بدرجة (45°م - 50°م) كما تسمح بإجراء تخفيف للجراثيم الموجودة بكثافة في الوسط ، وهذا التخفيف يتضمن استخدام تراكيز متدرجة من معلق الجراثيم أو من الأوساط المراد استنبات جراثيمها. ويفضل استخدام 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. ويمكن تلخيص مراحل هذه الطريقة بالمخطط التالي: (شكل 42).

ونذكر بأن عملية التجانس (التوزيع المنتظم للجراثيم) مهمة جداً في هذه الطريقة ، فيجب علينا أن ندور الأنبوب 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 استخدام التخفيف المناسب بالحصول على مستعمرات سطحية منفصلة من جهة ومستعمرات مدفونة في الوسط المغذي من جهة أخرى، مما يمكن من عزلها وإتمام دراستها .



الشكل 42

رسم يوضح مراحل طريقة الآغار المصبوب مع التخفيف

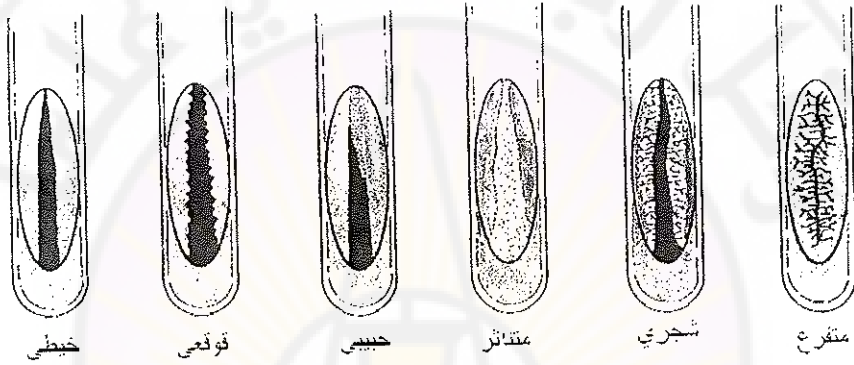
صفات المزارع ونوع النمو

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

أولاً : مظاهر النمو على أنبوبة الآغار المغذي المائلة : يمكن توصيف شكل النمو على الآغار المائل بعد عملية التلقيح وفق خط مستقيم متجهاً من أسفل الأنبوبة إلى أعلاها، ومن ثم الحضان المناسب ليتم النمو الجيد ، حيث تختلف أشكال النمو من نوع جرثومي إلى نوع آخر (شكل 43) وهي كالتالي:

- 1- نمو خيطي منتظم على طول خط التلقيح .
- 2- نمو مسنن (قوقعي) تكون فيه أطراف خط النمو مسننة .

- 3- نمو حبيبي (سحي) تكون المستعمرات النامية منفصلة أو شبه مندمجة على طول خط التلقيح .
- 4- نمو متناثر حيث يكون النمو رقيقاً على شكل ستار وعادة يكون منتشرأ .
- 5- نمو شجري (متفرع) يكون النمو على شكل شجرة .
- 6- نمو جذري يكون على شكل الجذر .



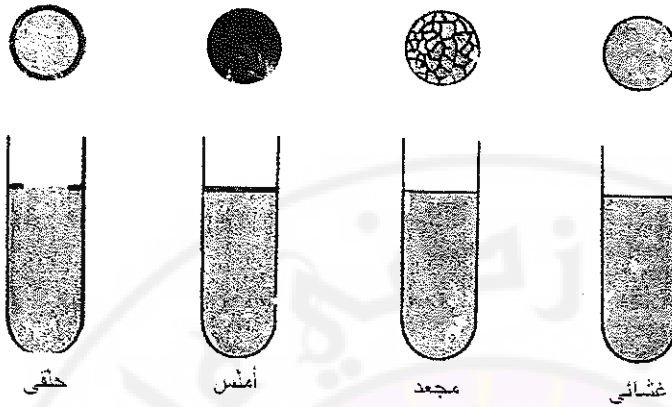
الشكل 43

مظاهر النمو على سطح أنبوبة آغار مائلة

ثانياً : مظاهر النمو الجرثومي في بيئة المرق المغذي : يصنف النمو في المرق كما يلي :

- أ- السطح : أشكال النمو السطحي أربعة (شكل 44) وهي :
- 1- حلقي : يكون النمو على شكل حلقة حول حواف الأنبوبة .
- 2 - أملس رقيق: يكون النمو على شكل طبقة رقيقة ملساء تغطي سطح البيئة.
- 3- غشائي: النمو يشبه الغشاء الرقيق ، لكنه أرق من سابقه .

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



الشكل 44

أشكال النمو السطحي في بيئة المرق المغذي

ب - تحت السطح : النمو يكون على إحدى الصور الآتية :

1- عكر : يظهر النمو بشكل سحابي .

2- حبيبي : يظهر النمو على شكل حبيبات صغيرة .

3- صوفاني : يظهر النمو على شكل كتل صغيرة طافية ومنتشرة .

4- قشري (رقائق) : يظهر النمو على شكل كتل كبيرة في المعلق .

ج - الراسب : تتفاوت كمية الراسب في الأنبوبة من لا شيء إلى كمية

كبيرة. لتوصيف نوعية الراسب نهز الأنبوبة بحيث يصبح الراسب على

شكل معلق ، ويمكن أن يكون عندها الراسب إما حبيبياً أو رقيقاً (قشرياً)

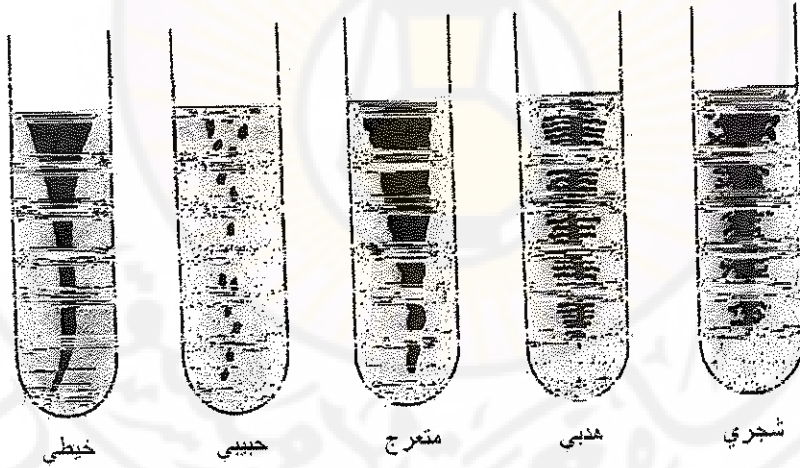
أو خيطياً حريرياً أو لزجاً (لاختبار اللزوجة يمكن أن نلامس قاع

الأنبوب بإبرة التلقيح) .

د - كمية النمو: لتقدير كمية النمو يجب هز الأنبوبة ثم نقدر النمو بالنظر على أنه ضئيل أو متوسط أو غزير .

ثالثاً : مزرعة الوخز في الجيلاتين : بعد تلقيح أنابيب الجيلاتين المغذي العميق بطريقة الوخز والحض بالحرارة المناسبة ، يتم فحص الأنابيب من النواحي الآتية :

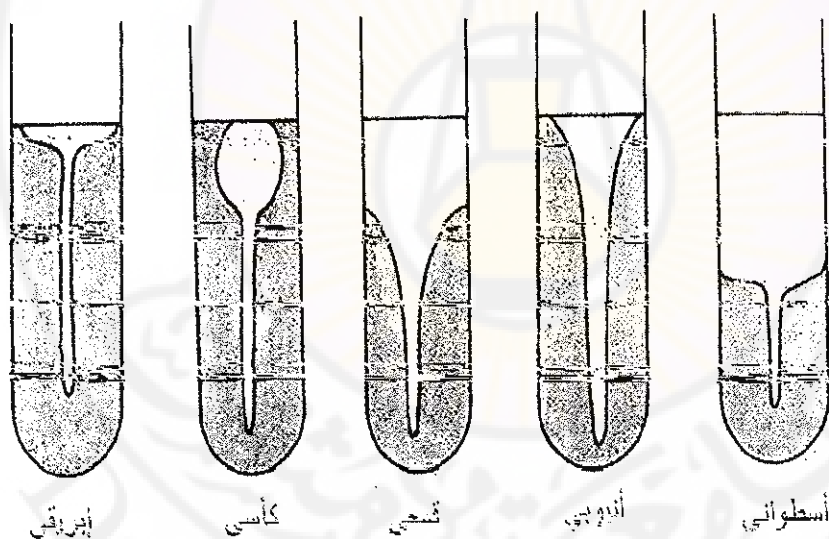
- 1- النمو : وجوده من عدم وجوده .
- 2- نوع النمو : أغلب الجراثيم لا تنمو على الجيلاتين المغذي، ولكن لو نمت بدون إسالة الجيلاتين فكثيراً يكون النمو على إحدى الصور الموضحة في (الشكل 45) . وهي نمو خيطي مستقيم يحدث في منطقة الوخز فقط، نمو حبيبي، نمو متعرج، نمو هديبي، نمو شجري متفرع .



الشكل 45

النمو في مزارع الوخز الجيلاتينية بدون إسالة الجيلاتين

- 3- إسلالة الجيلاتين: بعض الجراثيم تشكل إنزيمه الجيلاتيناز Gelatinase التي تعمل على حلمهه الجيلاتين وتؤدي إلى سيولته أو ميوعته، وتكون الإسلالة حسب النماذج الموضحة في (الشكل 46) وهي :
- أ- إسلالة على شكل طبق صغير (إبريقي) .
 - ب- إسلالة على شكل كأسى .
 - ج - إسلالة على شكل قمع أو مخروط مقلوب .
 - د- إسلالة على شكل أنبوبي .
 - هـ - إسلالة على شكل أسطوانى، يكون التحلل في الجزء العلوي من الأنبوبة فقط .



الشكل 46

أنواع إسلالة الجيلاتين

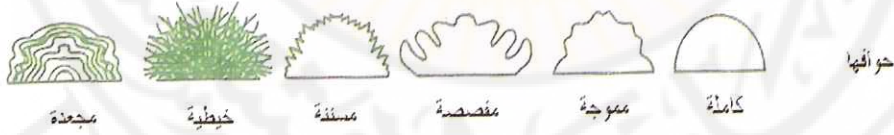
رابعاً : طبق الآغار المغذي: تدرس المستعمرات النامية على سطح الآغار المغذي باستخدام عدسة يدوية أو بمساعدة مكبرة ، حيث يتم تسجيل ما يلي: لون المستعمرة، وعتامة المستعمرة، وشكل المستعمرة، وارتفاع المستعمرة عن سطح البيئة، وحافة المستعمرة، وبحسب ما هو موضح في (الشكل 47):



أ - شكل (مظهر) المستعمرة على سطح طبق الآغار



ب - ارتفاع المستعمرة عن سطح طبق الآغار



ج - حواف المستعمرة النامية على سطح طبق الآغار

الشكل 47

يوضح الشكل أوصاف المستعمرات النامية على سطح الآغار

خامساً : طبق الآغار المدمى: وهو وسط مغذي صلب مضاف إليه الدم بنسبة 5-7.5 % يفيد في تحديد قدرة الجرثوم على حل الدم وذلك وفق ما يلي :

- 1- وجود انحلال كامل للدم تكون فيه المنطقة المحيطة بالمستعمرات خالية تماماً من اللون الأحمر.
- 2- وجود انحلال جزئي للدم تكون فيه المستعمرات محاطة بهالة خضراء .
- 3- عدم وجود انحلال للدم ، حيث لا توجد حول المستعمرات منطقة تحلل .

عزل وحفظ المزارع الجرثومية :

يمكن عزل الجراثيم من بيئتها الطبيعية (ماء- هواء- تربة- أغذية- عينات مرضية ... الخ). وتختلف طرائق العزل هذه حسب البيئة، فكل بيئة خاصية معينة ومميزة سيتم معالجتها في مناهج مختصة. وبشكل عام يتم عزل الأنواع الجرثومية بدءاً من المستعمرات المنفصلة النامية فوق وسط من الآغار المغذي والمستتبطة بطريقة الخطوط 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 .

ويتم حفظ الجراثيم الهوائية باستنباتها بطريقة الآغار المائل أما الجراثيم اللاهوائية فتتطلب طريقة مختلفة، حيث تستخدم طريقة الآغار

المطعون (الوخز) Agar-Stab ، وبعد التلقيح تضاف طبقة من الزيت المعدني فوق الوسط المغذي لمنع التبخر ومنع وصول الأوكسجين إلى المزارع الجرثومية .

ولكن استتبات وحفظ الجراثيم اللاهوائية الإجبارية يتطلب استخدام أوساط تتمتع بخصائص إرجاعية قوية مثل وسط تيوغليكولات السائل Thioglycolate broth الذي يحوي على الغلوكوز Glucose والسيستين Cystine بالإضافة إلى تيوغليكولات الصوديوم التي تؤدي إلى خفض جهد الأكسدة والاختزال ، والصبغة. Resazurine التي توضح وجود الأوكسجين من عدم وجوده ، حيث تميل إلى اللون الزهري في وجود الأوكسجين ، لذلك يكون اللون في أعلى الأنبوب زهرياً أما أسفل الأنبوب فيكون عديم اللون. وينبغي تجديد الجراثيم المعزولة والمحفوزة بين مدة وأخرى، لأن بقاءها مدة طويلة جداً في الثلاجة يمكن أن يؤدي إلى حدوث الطفرات.

ولنتجنب ضرورة تجديد الوسط والنقل المتكرر للمزارع النقية نعد إلى حفظها في شروط تسمح ببقائها حية دون نمو أو تكاثر ودون أن تعاني من تغيرات وراثية أو فيزيولوجية . وتعد طرق التبريد والتجفيف أفضل الطرق 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 الزراعة المتكررة في بيئات حديثة التحضير ضمن أنابيب من الآغار المغذي المائل . وتختلف المدة الزمنية للحفظ على حسب النوع الجرثومي ونوع

البيئة والظروف الخارجية . تصلح هذه الطريقة عادة لحفظ الجراثيم عدة أسابيع (حوالي الشهرين).

2- الحفظ تحت طبقة من الزيت المعدني:

تستطيع العديد من الأنواع الجرثومية أن تظل حية لشهور وسنين تحت طبقة من الزيت المعدني المعقم. حيث يتم تنمية الجرثوم في البيئة المناسبة 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 البيئة) وتحفظ المزارع في الثلاجة عند الدرجة صفر إلى 20°م ، ويتم مراقبة حيوية هذه الجراثيم على أوقات زمنية متتالية ، ويمكن نقل المزرعة الجرثومية من تحت الزيت المعدني إلى بيئة حديثة التحضير مع أخذ الحذر إذ إن الزيت المعدني قابل للاشتعال.

3- الحفظ بالغلiserول المعقم:

نمى الجرثوم بأنبوب حاوي على بيئة سائلة مناسبة، حتى يصل لبداية العكارة (ما يعادل 0.3 Mc. Farland)²، ثم نضيف عليه مقدار من الغلiserول المعقم يساوي ثلث كمية البيئة السائلة، ونمزجها جيداً، ثم نحضن لمدة ساعة كاملة في درجة حرارة مناسبة.

نوزع ما بداخل الأنبوب على أنابيب صغيرة معقمة (مثل أنابيب التنفيل سعة 1.5 مل ذات الغطاء، Ependrove) بمقدار 1 مل لكل أنبوب

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

ونحفظها بالمجمدة عند درجة حرارة - 20 م° - 80 م°، وعند الاستعمال نقوم بتنشيط الخلايا الجرثومية بزراعتها على أوساط استنبات سائلة مناسبة.

4- التجميد المباشر :

ويتم ذلك بتجميد الخلايا الجرثومية مباشرة عند الدرجة صفر إلى -20 م°، وربما تتجح هذه الطريقة ولكن لا يوصى بإتباعها حيث تتعرض الخلية الجرثومية للتكسير، ومع ذلك فهناك بعض الأنواع الجرثومية يمكن أن تحفظ بهذه الطريقة لمدة تتراوح بين ستة أشهر إلى سنتين.

5- التجفيف :

تموت معظم الأنواع الجرثومية إذا تركت تجف في المختبر إلا أن الأنواع التي تستطيع عمل الأبواغ Spores يمكن أن تحفظ بالتجفيف في الوسط المناسب سواء في التربة أو في شرائط أو أقراص الترشيح أو في الجيلاتين .

ثانياً : الحفظ لمدة طويلة الأجل :

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

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

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



الفصل الثامن

استنبات الجراثيم اللاهوائية المجرية

Obligate Anaerobic

الخطوة المتبعة في دراسة الجراثيم اللاهوائية :

تشمل هذه الخطوة زرع وعزل هذه الجراثيم وتحديد نوعيتها اعتباراً من بيئتها الطبيعية .

الوسائط المستخدمة لنزع الأوكسجين من أوساط الاستنبات :
الغاية من ذلك نزع الأوكسجين الحر من الأوساط الزرعية وذلك بوسائط مختلفة .

1- وسائط فيزيائية : وتتم بوضع الوسط الزراعي بحمام مائي غال لمدة 20/ دقيقة وهذا ما ندعوه بتجديد الوسط وذلك لإخراج الأوكسجين المنحل بالوسط . وفي حالة الوسط السائل نضيف زيت البرافين على سطح الوسط لعزله عن الهواء .

2- وسائط كيميائية: وذلك بإضافة مواد مرجعة للوسط تثبت الأوكسجين الحر بعملية الإرجاع ، بشرط ألا تعيق هذه المواد نمو الجراثيم مثل حمض البيروغاليك - حمض التيوغليكوليك - السيستئين - حمض الأسكوربيك .

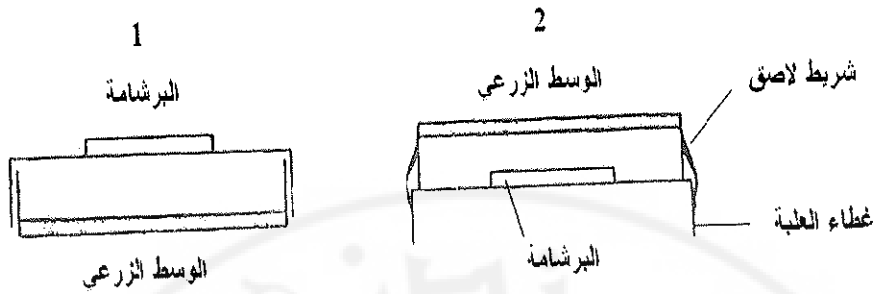
ويفضل عادةً زرع الجراثيم اللاهوائية على أوساط تحتوي الغلوكوز لأن إضافة الغلوكوز على وسط قلوي سيؤدي عند وضع الوسط في حمام مائي غال إلى تحرر بعض المواد المرجعة التي تساعد على النمو اللاهوائي.

3 - وسائط حيوية : وذلك بإضافة أجزاء من الأعضاء أو الأنسجة أو الدم أو المصل بصورة عميقة إلى الأوساط الزرعية (مثلاً إضافة جزء من الكلية أو الكبد توضع في وسط يحوي المرق المغذي) .
الطرائق المستخدمة في زرع الجراثيم اللاهوائية :
هناك طريقتان لزرع الجراثيم اللاهوائية :

1- طريقة الزرع العميق : وهي مقترحة من قبل المدرسة الفرنسية وفيلون Veillon . وذلك باستعمال وسط الغراء (الآغار) الحاوي على الغلوكوز بنسبة 6 غ / ليتر موضوع بأنايب أبعادها 9×180 ملم . وهذه الأنايب تزرع في العمق وهي بالحالة المصهورة بدرجة حرارة $42-45^{\circ}\text{C}$ بمَصَّ دقيق . كما يمكن أن تتم الزراعة بالعمق ضمن أطباق بتري (الآغار المصبوب) . وهنا تظهر المستعمرات الجرثومية ضمن الآغار بأشكال مختلفة عما شاهدناه من أشكال للمزارع النامية على سطح الآغار .

2- طريقة الزرع على السطح : وهي مقترحة من قبل المدرسة الانكليزية . وتستعمل نفس الأوساط السابقة، ولكن في أطباق بتري بعد نزع الأوكسجين من الوسط ويتم الزرع على السطح والحضن في شروط لا هوائية، وفق أنظمة مختلفة نذكر منها :

أ - استخدام البيروغالول Pyrogallol : وهو مسحوق قلوي ، حيث نضع برشامة تحوي 2 غ منه على السطح الخارجي لغطاء طبق بتري ، ثم نضع الغطاء فوق العلبة بوضع مقلوب، ونثبت الغطاء على العلبة بشريط لاصق. (شكل 48) .

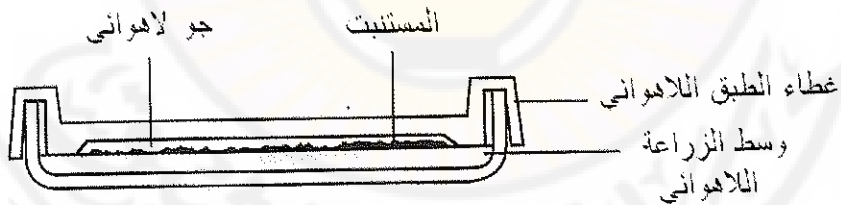


الشكل 48

استخدام برشامة البيروغالول في طبق بتري

وقد تم تصميم أطباق أكثر ملائمة للزرع اللاهوائي كما في (الشكل

:49)

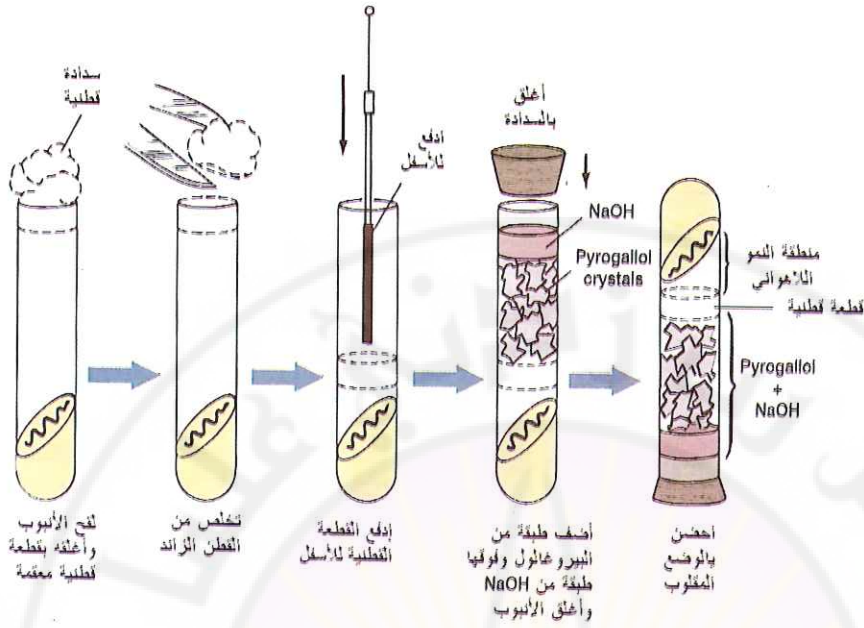


الشكل 49

طبق الزرع اللاهوائي

كما أنه يمكن استخدام البيروغالول مع أنابيب الآغار المائل (الشكل

: 50)



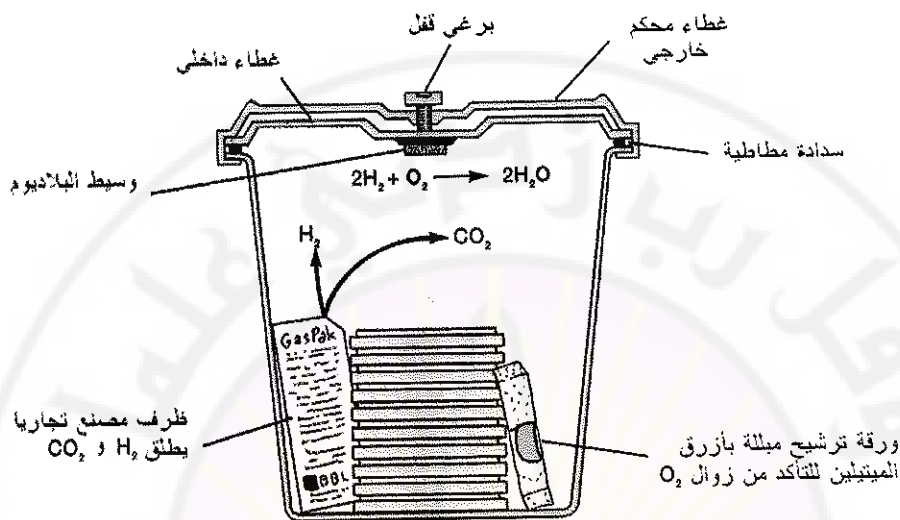
الشكل 50
استخدام البيروغالول في الأنبوب

ب - الجرة اللاهوائية : (شكل 51) كانت الجرة اللاهوائية فيما مضى معدنية (وعاء معدني محكم الإغلاق) ندخل فيها تياراً من الهيدروجين بعد تفريغ الهواء، ثم بتيار كهربائي متصلاً بسلك محاط بالإمبانت ومشرب بكلور البلاديوم، يمكن أن نجعل الأوكسجين يتحد مع الهيدروجين ويكون الماء. أما حالياً فالجرة اللاهوائية المستخدمة بلاستيكية، يوضع بداخلها عادة الوسيط البارد وهو البلاديوم .

ويمكن جعل الوسط داخل الجرة لا هوائياً بإحدى الطريقتين التاليتين :

1- طريقة توليد الغاز: نستخدم ظرفاً مغلقاً مجهزاً تجارياً يستعمل لمرة واحدة يحتوي مضغوطتين: إحداهما حمض الستريك مع بيكربونات

الصوديوم لإطلاق غاز ثاني أكسيد الكربون، والثانية بورهيدرات
الصوديوم.



الشكل 51
الجرة اللاهوائية

نضع الظرف + أطباق بتري + 10 مل ماء عادي داخل الجرة ثم
تغلق . يحدث التفاعل، فينتقل غاز ثاني أكسيد الكربون من المضغوطة
الأولى وغاز الهيدروجين من المضغوطة الثانية ، وبوجود وسيط البلاتينيوم
يتفاعل الهيدروجين مع الأوكسجين ليعطي الماء خلال 15 - 30 دقيقة. (إن
غاز ثاني أكسيد الكربون ضروري لنمو الجراثيم اللاهوائية ولا يدخل في
التفاعل)، علماً بأنه تم حالياً تجهيز ظروف تجارية لا تحتاج لإضافة أي شيء
آخر إلى الجرة .

عادةً نضيف شريط مشعر من زرقة الميثيلين الذي يزول لونه عند غياب الأوكسجين، وذلك للتأكد من خلو الجرة من الأوكسجين . يحتاج زوال لون المشعر إلى 5 - 6 ساعات ، أما انخفاض نسبة الأوكسجين إلى أقل من 1% فيحتاج إلى نصف ساعة ، بعدها فقط نضع الجرة في الحاضنة .

ملاحظة:

وسيط البلاديوم يفقد 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 بالحاضنة، لأن الأوكسجين مازال موجوداً، وسيكون شديد السمية على اللاهوائيات في أثناء انقسامها وتكاثرها .

2- طريقة التخلية والاستبدال : عن طريق تزويد الحجرة بصمامات تسمح بتخلية الهواء واستبداله بمزيج لاهوائي من الآزوت بنسبة 85 % والهيدروجين بنسبة 10 % وغاز ثاني أوكسيد الكربون بنسبة 5 % .

ج - طريقة المحفظة الحيوية : وهي محفظة بلاستيكية تتسع لعدد من الأطباق شفافة غير نفوذة للغاز نضع بداخلها ظرفاً تجارياً للتخلص من الأوكسجين ، تغلق بإحكام (يمكن لحماها بالحرارة) رخيصة الثمن ويمكن مراقبة النمو داخلها دون فتحها . (الشكل 52)



الشكل 52
المحفظة الحيوية

دراسة أشكال المستعمرات النامية بالزراع اللاهوائي:
في حالة الزرع العميق يمكن تصنيف أشكال المستعمرات في نموذجين :
آ - أشكال منتظمة:

عدسية الشكل بسيطة أو قلبية الشكل أو وريقة ثنائية أو ثلاثية ، كما
في (الشكل 53) وهي عبارة عن مستعمرات لا تملك خميرة الغالاكتاناز
Galactanase التي تفكك مادة الغالاكتان الموجودة في الآغار ومن ثم تبقى
المستعمرات في مكانها دون أن تنتشر.

ب - أشكال غير منتظمة:
وتكون أشكال المستعمرات مختلفة مدورة أو غير منتظمة أو متفرعة
كأغصان الأشجار، وهذه مستعمرات لجراثيم تملك إنزيم الغالاكتاناز التي
تفكك الآغار وتتشعب مكان الآغار المتفكك .



الشكل 53

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 تعيق رؤية أشكال هذه المستعمرات، وهذا من مساوئ طريقة الزرع العميق. أما الزرع على السطح فإنها تعطينا مستعمرات مماثلة لمستعمرات الجراثيم الهوائية وأحياناً مستعمرات من النموذج الخشن أو من النموذج الأملس.

الفصل التاسع

الفحص المجهرى للجراثيم

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

استعمال المجهر لفحص المحضرات الجرثومية :

من أجل رؤية الجراثيم لابد من تكبيرها من 600 - 1200 مرة، ولفحص المحضر المهيأ والملون بالمجهر نستعمل العدسة الغاطسة التي تميز عن 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 نستعمل عادة الإنارة الذاتية أو المرآة المسطحة إن وجدت، ونرفع المكثف إلى الأعلى مع فتح الحطار كاملاً. نضع الصفيحة على الرف ونثبتها بالقابضين، ونفحص بالتكبير 40 أو 60 أولاً حتى وضوح الرؤية ثم ندير على العدسة الغاطسة، ونضبط الرؤية بلولب الإحكام البطيء. أو أن 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، وبعد ذلك نجري المطابقة باللولب الصغير (البطيء) .

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

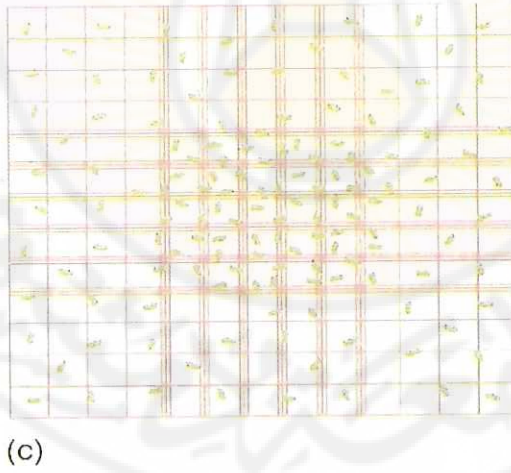
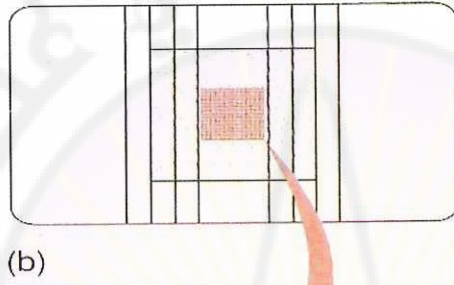
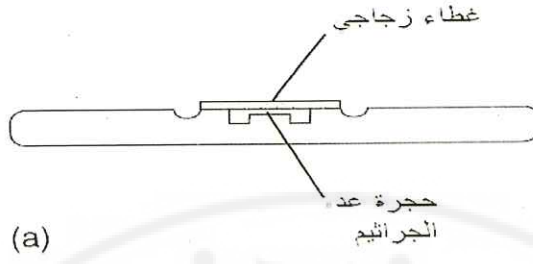
وإذا أردنا حفظ المحضر، نمسحه بلطف بقطعة من القطن المبللة بالزيتول، ونتركه ليالجف، ثم يحفظ لمدة طويلة (يمكن أن نسحب الماء من الخلايا بالكحول المطلق ثم نزيل أثر الكحول بالزيتول، ونستر المحضر بساترة بوساطة بلسم كندا ، وبذلك يكون قد حفظ بشكل دائم) .

– أما الفحص المجهرى للجراثيم، فيتم إما مباشرة بالحالة الحية أو بعد إجراء عملية التثبيت والتلوين لها.

أولاً - الفحص المباشر:

يجرى هذا الفحص على الجراثيم الحية غير المصبوغة والهدف منه التحري عن وجود الجراثيم وتقدير عددها الأولي في العينة المدروسة، وذلك باستعمال صفائح خاصة مثل صفيحة بتروف هوسر Petroff - Hausser ، ودراسة شكلها الخارجي وحجمها وطريقة تجمعها إن أمكن ، والأهم من ذلك هو دراسة حركتها .

صفيحة بتروف هوسر Petroff - Hausser : (الشكل 54) وهي صفيحة فيها حجرة للعد تساعد على إجراء إحصاء لعدد الجراثيم في عينة ما، بشكل دقيق وسريع ودون تلوين ، تستخدم على التكبير $400 \times$ - أو $500 \times$. حجرة العد مقسمة إلى 25 مربعاً تغطي مساحة 1 ملم² ولها عمق مقداره 0,02 ملم أي أن حجمها معلوم ويساوي 0,02 ملم³ . نختار أفضل تركيز للجراثيم في مربع واحد ونحصىها ، ثم نضرب العدد بالرقم 25 فنحصل على وسطي عدد الجراثيم في حجم حجرة العد ، ومنه يمكن حساب عدد الجراثيم في المليتر الواحد من العينة ، بضرب الرقم الناتج بالعدد 1000×50 .



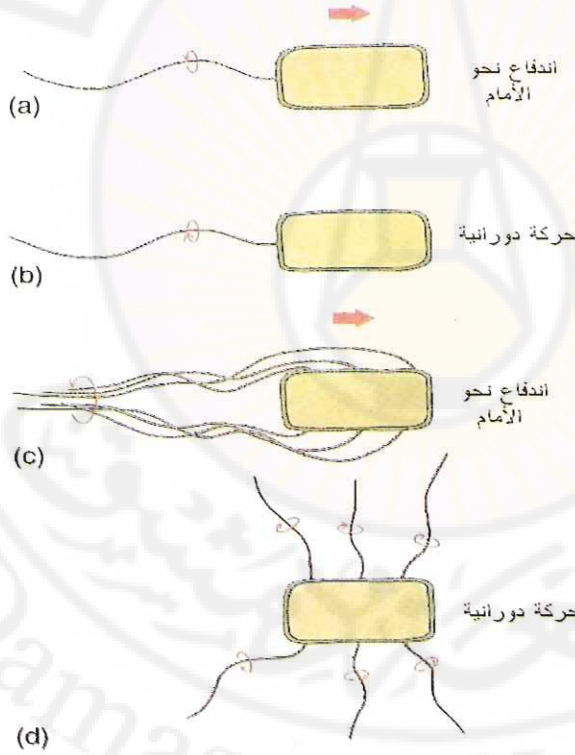
الشكل 54

حجرة بتروف هوسر للعد

(a) منظر جانبي للحجرة - (b) منظر علوي للحجرة - (c) تكبير شبكة المربعات .

_ دراسة الحركة عند الجراثيم :

يجب التفريق بين الحركة الحقيقية الناتجة عن وجود السياط حيث تندفع الجراثيم كالسهم بحركة مستقيمة أو بحركة دورانية انقلابية، وهذا يعود لتوزيع السياط في الخلية الجرثومية كما هو موضح في (الشكل 55) 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 .



الشكل 55

نمط الحركة عند الجراثيم

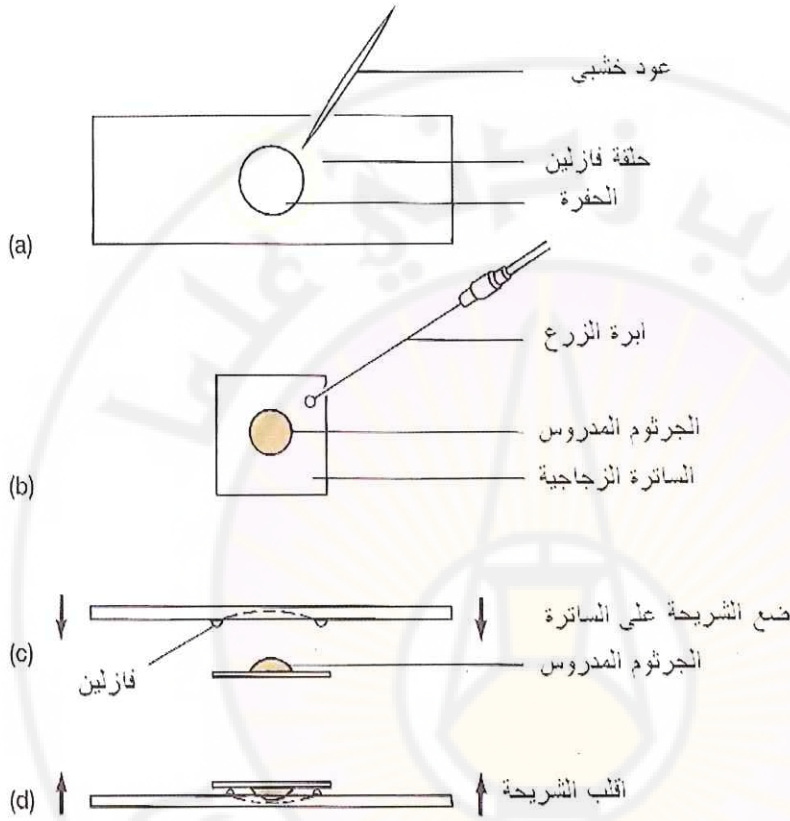
يجرى هذا الفحص بالقطرة المعلقة Hanging drop .
الأدوات والمواد اللازمة :

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

طريقة العمل : (الشكل 56)

- 1- نظف الصفيحة الزجاجية جيداً ، ونظف الساترة .
- 2- ضع بواسطة 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 .
- 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 سوف تستطيع التفريق بين الجراثيم المتحركة وغير المتحركة وتمييز طريقة الحركة .



الشكل 56

آلية إجراء القطرة المعلقة

ثانياً - 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 العبيط (كروية السياط أو المحفظة) .

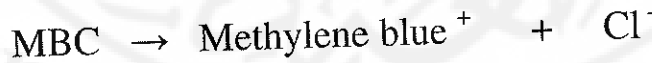
كما أنه بالتلوين يمكن معرفة الخواص التلوينية للخلية الجرثومية، التي تفيد في معرفة هوية الجرثوم (مثال ذلك طريقة غرام التي تميز بين نمطين من الجراثيم، ودراسة مقاومة الجراثيم للكحول والحمض إلخ).
قبل أن نستعرض طرق التلوين يجب أن نأخذ فكرة بسيطة عن الملونات وطبيعتها .

طبيعة الملونات :

الملونات هي مواد صباغية تلون الجراثيم، ويكون هذا التلوين إما بالتصاق المادة الملونة وترسبها على الجرثوم (على سطح الخلية الجرثومية) ومن أمثلة الترسيب عملية التفضييض بأملاح الفضة، أو الامتزاز على سطح الخلية (التلوين السلبي Negative staining)، أو بدخول هذه الملونات عبر الغلاف الخلوي للجرثوم وتكوين معقدات مع مركباته الكيميائية.
إذاً التلوين يكون إما بطريقة فيزيائية (امتزاز وترسيب) أو بطريقة كيميائية (اتحادات كيميائية وتشكيل معقدات) .

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

والملونات بشكل عام عبارة عن أملاح يكون فيها أحد الشوارد ملوناً أو تكون معتدلة ، فإذا كان الجزء المشحون إيجابياً هو حامل اللون مثال أزرق الميتلين :



حيث إن زرقة الميتلين هو ملح كلوري لزرقة الميتلين يكون الجزء المشحون إيجابياً هو حامل اللون ، ويؤدي الاختلاف في الشحنة إلى تعشق الخلايا الجرثومية لهذا الملون حيث إن هذه الخلايا تكون ذات شحنة سلبية

عندما توجد في وسط ذو pH قريب من الاعتدال ، وتحصل عملية التلوين باتحاد أزرق الميتلين إيجابي الشحنة مع الخلايا ذات الشحنة المعاكسة . إن الملونات المشابهة لأزرق الميتلين والتي يكمن اللون فيها في الجزء إيجابي الشحنة تدعى بالملونات القلوية ومن أمثلتها الفوكسين - الزعفران - بنفسجية الجانسيان (البللورات البنفسجية) .

أما الملونات التي يكون الجزء الملون فيها هو المشحون سلبياً أي الشاردة السالبة هي حاملة اللون، فتسمى الملونات الحامضية، ومثالها الايوزين المستخدم بشكل ايوزينات الصوديوم و يتشرد إلى Na^+ + Eosinate⁻

ومن أمثلة الملونات الحامضية أيضاً حمض المر .

وهناك ملونات معتدلة مثل ايوزينات زرقة الميتلين - ايوزينات الأزور . وبصورة عامة تنتخب النواة الملونات الأساسية وتنتخب الهيولى الملونات الحامضية .

تحضير النموذج للتلوين : وهو تحضير الغشاء الجرثومي (الشكل 57) ويكون إما ابتداءً من مستعمرة نامية على وسط صلب ، أو من بيئة سائلة .
تحضير الغشاء الجرثومي وتثبيته ابتداءً من مستعمرة صلبة :

إن الفحص المجهرى للجراثيم الملونة يقتضي قتلها أولاً، وتثبيت الخلايا على الصفيحة الزجاجية ثانياً، وذلك حتى لا تتجرف هذه الخلايا في أثناء عملية التلوين، ولتحقيق ذلك اعتمد الطريقة البسيطة الآتية :

1- نظف الصفيحة الزجاجية جيداً بمزيج من الكحول وحمض كلور الماء

H Cl بنسبة 9 : 1.

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

3- افرش اللوحة الجرثومية وذلك بدلكها بإبرة البلاتين بحركة دورانية حتى تشكل غشاءً رقيقاً متجانساً نسميه اللوحة الجرثومية Smear .

4- جفف اللوحة 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 تخریب بنية الخلية الجرثومية . ويمكن التأكد من أن حرارة الصفيحة مناسبةً بجعلها تلامس ظهر اليد ، إذ ينبغي أن تكون دافئةً وغير حارقة . تسمى هذه العملية بعملية التثبيت Fixation . يمكن إجراء عملية التثبيت هذه باستعمال الكحول بتركيز 96% وتترك من 10 - 20 ثانية ومن ثم تمرر الصفيحة على اللهب للتخلص من آثار الكحول المتبقية ، أو باستعمال حمض الأوسمي 1% ، أو بمزيج من الغول والايتر أو الغول الميثيلي .

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

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

تحضير غشاء رقيق من بيئة 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 رقيقاً ، وفي حال كون المعلق كثيفاً ، خفف المزرعة قبل استعمالها .

3- اترك الغشاء يجف في درجة حرارة الغرفة .

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

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

طرق التلوين :

هناك عدة طرق لتلوين الجراثيم تختلف باختلاف الأنواع الجرثومية وغاية التجربة . وطرق التلوين إما بسيطة أو مركبة .

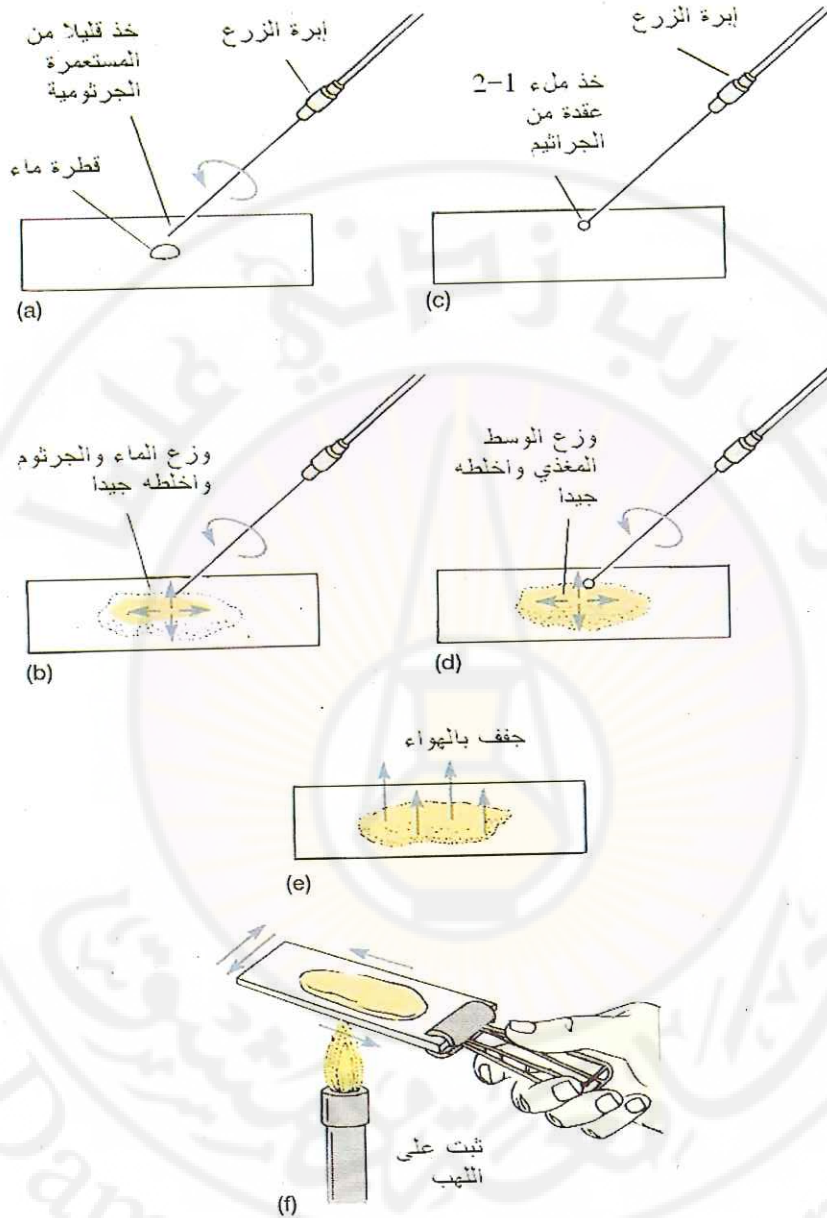
التلوين البسيط Simple staining :

ويتم بوضع الملون بتماس مع الغشاء الجرثومي مدة تتراوح بين دقيقة واحدة وعدة دقائق حسب طبيعة وكثافة الملون، فيبدو عندها الجرثوم مصبوغاً بلون ذلك الملون .

ويستفاد من هذه العملية بمعرفة وجود أو عدم وجود الجراثيم وتحديد شكل الجراثيم واصطفاقها . من أمثلتها طريقة التلوين بزرقة الميتلين .

ابتداء من مستعمرة صلبة

ابتداء من بيئة سائلة



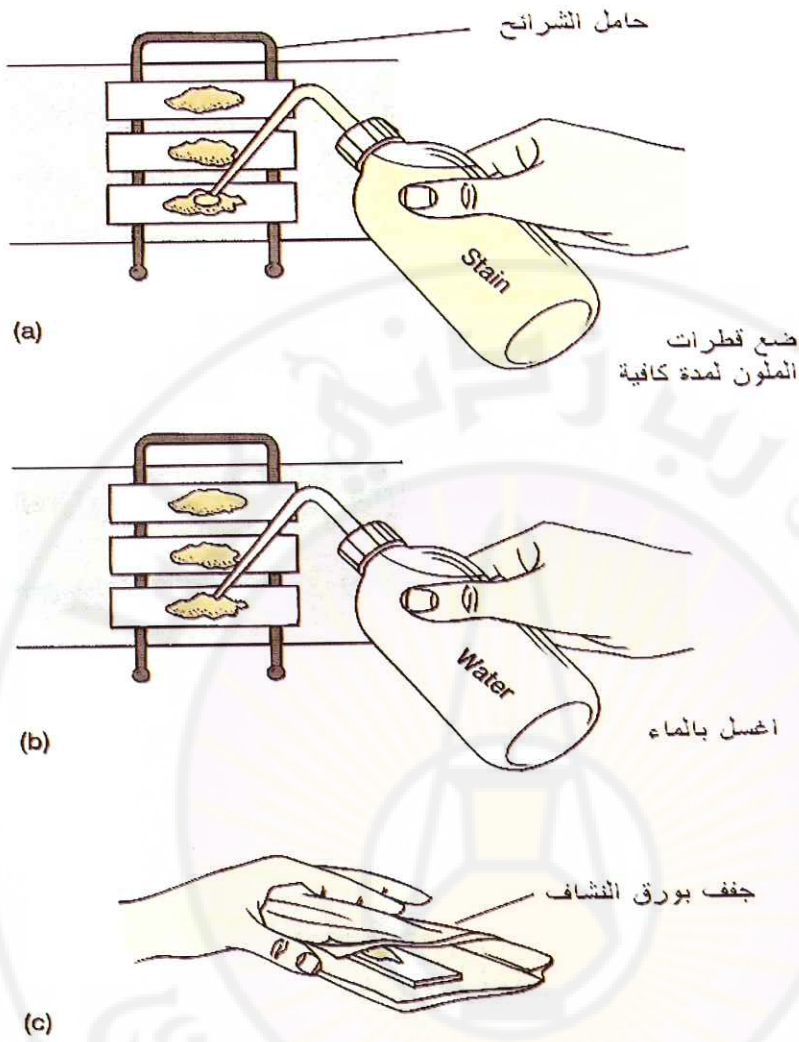
الشكل 57
آلية تحضير الغشاء الجرثومي

الأدوات والمواد اللازمة :

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

طريقة العمل : (الشكل 58)

- 1- حضر الغشاء الجرثومي وثبته بالطريقة السابقة .
- 2- اغسل الغشاء الجرثومي بتيار خفيف من الماء كي لا تتجرف الخلايا الجرثومية من سطح الصفيحة الزجاجية .
- 3- ضع على الغشاء قطرة من الملون لمدة مناسبة 2- 3 دقائق ، على أن يغمر الملون الغشاء الجرثومي .
- 4- أمل 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- جفف 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- دون ملاحظاتك حول التجربة (لون الخلايا - تجمعها - شكلها الخ) مع الرسم .



الشكل 58

آلية إجراء التلوين البسيط

التلوين السلبي Negative staining :

تعدّ طريقة التلوين السلبي للأغشية الجرثومية ذات أهمية كبرى في تمييز الخلايا الجرثومية، وتستخدم هذه الطريقة عند الرغبة في قياس حجم البكتيريا

حيث تظهر الخلايا بحجمها الطبيعي لعدم استخدام الحرارة مطلقاً في أثناء إجراء الصبغ بهذه الطريقة . كما تستخدم لدراسة الشكل الظاهري للجراثيم . وتسمى بالصبغة السالبة؛ لأنه يتم صبغ الشريحة دون الخلايا الجرثومية، فتظهر الخلايا شفافة غير مصبوغة بينما بقية الشريحة تظهر ملونة ، ويرجع السبب في عدم دخول الصبغة جسم الخلية هو أن الصبغة المستخدمة تكون ذات جزيئات كبيرة لا تتفذ خلال الجدار الخلوي مثل الحبر الهندي (الصيني) أو تكون صبغات حامضية عديمة أو قليلة التأثير على الخلايا الجرثومية .

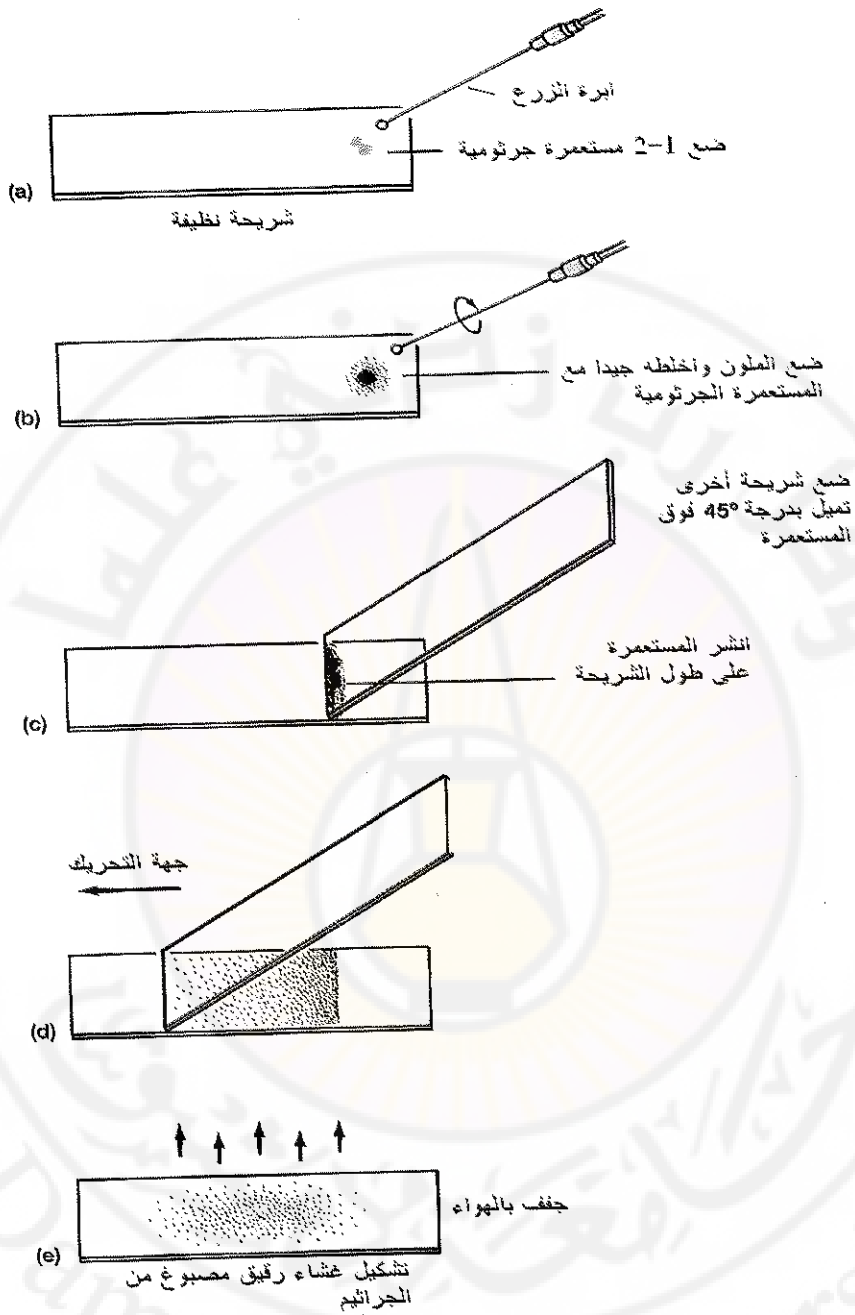
آلية التلوين السلبي : (الشكل 59)

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 استخدامها مثل النيجروسين Nigrosin أو الحبر الهندي (الصيني) أو محلول الإيوزين ، وامزجهم مع الجراثيم بشكل جيد.

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

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



الشكل 59
آلية التلوين السلبي

يفيد التلوين السلبي في قياس حجم الخلايا الجرثومية.

التلوين المركب :

سميت الطريقة بذلك لاستعمال أكثر من ملون واحد فيها ، وتتضمن هذه

الطريقة عدة مراحل وهي :

1- مرحلة التلوين : ويتم فيها وضع الملون المراد استعماله على

الغشاء لزمن كاف .

2- مرحلة الترسيخ : ويتم فيها تقوية فعل الملون ونشبيته (تشكيل

معقدات أكثر ثباتاً ورسوخاً داخل الخلية) وذلك باستعمال محلول

لوغول أو حمض الفيني أو حمض الخل أو غيرها حسب الغاية

المرجوة .

3- مرحلة التمييز : ويتم فيها توضيح العينة وذلك بإزالة الملون من

بعض الخلايا باستخدام الكحول أو مزيج من الكحول والخلون

(الأستون) أو حمض كلور الماء أو حمض الكبريت الرباعي أو

غيرها حسب الغاية المرجوة .

ومن ثم نستخدم الملون المتمم الذي يحمل لوناً مغايراً للون الملون

الأساسي المستعمل ، حيث تتلون به جميع الجراثيم التي زال منها اللون

بعملية التمييز .

- سوف نستعرض بعض الطرائق الأكثر استعمالاً .

طريقة صبغة غرام Gram staining :

تعتمد هذه الطريقة تقنية التلوين الاصطفائي حيث تستجيب الجراثيم بشكل

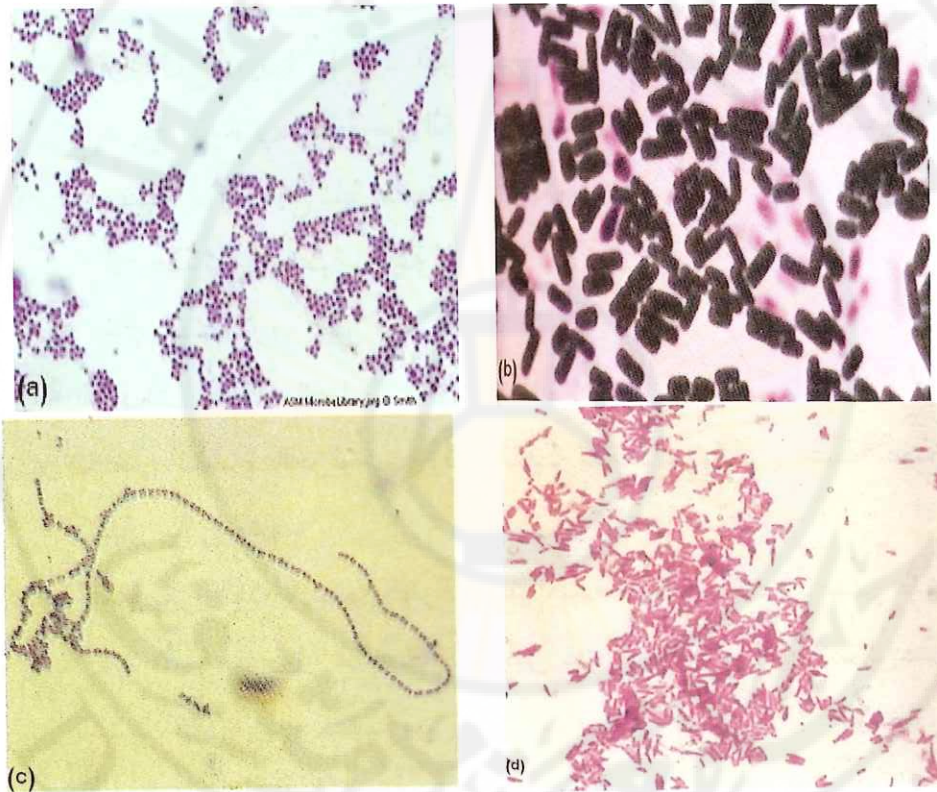
مختلف في أثناء عملية تلوينها تبعاً لخصائصها الكيميائية الحيوية وخاصة

التركيب الكيميائي للغلاف الخلوي .

وتعدُّ طريقة غرام في التلوين أكثر الطرق نفعاً واستخداماً في مجال تلوين الجراثيم ، حيث تمكننا من تمييز مجموعتين مختلفتين من الجراثيم بالرغم من تشابه شكلها وحجمها .

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

2- جراثيم سلبية غرام تأخذ تحت المجهر لوناً زهرياً. كما في (الشكل 60).



الشكل 60

يظهر الشكل جراثيم وقد تلوئت بصبغة غرام

(a) خلايا *Staphylococcus aureus* موجبة غرام - (b) عصيات *Clostridium*

perfringens موجبة غرام - (c) مكورات *Streptococcus pyogenes* موجبة غرام -

(d) عصيات *E. coli* سالبة غرام .

كما تعطينا هذه الطريقة فكرة جيدة عن سلوك الجراثيم بالنسبة لعدد من العوامل الفيزيائية والكيميائية بما يتضمنه ذلك من تطبيقات مفيدة خاصة في مجال مقاومة الجراثيم الممرضة باستخدام المضادات الحيوية والمركبات الكيميائية المختلفة .

الأدوات والمواد اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية فنية بعمر 24 ساعة .
- 2- محاليل الصبغات التالية : الكريستال البنفسجي - محلول لوغول Lugol (يود البوتاسيوم) - كحول بتركيز 96 % أو مزيج متساوي الحجم من الكحول والخلون - فوكسين أو سفرانين مخفف . (راجع دليل تحضير الصبغات) .
- 3- صفائح زجاجية نظيفة .
- 4- زيت الأرز النقي .

طريقة العمل : (الشكل 61)

- 1- حضر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف .
- 2- ضع على الغشاء بضع قطرات من صبغة الكريستال البنفسجي لمدة 2/1 دقيقة، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة ، ثم وبحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب .
- 3- اغمر الغشاء بمحلول لوغول لمدة دقيقة واحدة ، ثم أَمِلْ الصفيحة للتخلص من الصبغة الزائدة ، ثم وبحذر شديد اغسل بتيار خفيف من الماء مدة 5 ثوان حتى زوال كامل اللون من الماء المنسكب .

4- أزل اللون بالكحول الإيثيلي 96 % لمدة 2/1 دقيقة فقط, ثم اغسل بالماء الجاري .

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

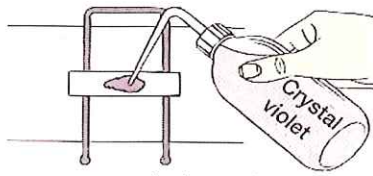
6- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء, أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة .

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

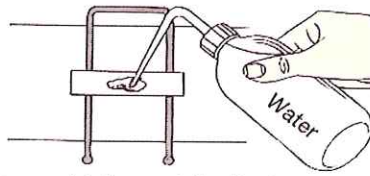
8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (من حيث اللون - شكل الخلايا - تجمعها) مع الرسم .

هناك بعض العوامل التي يمكن أن تؤدي إلى نتائج مغلوبة أو غير واضحة, وأهمها عمر المزارع الجرثومية المستخدمة ودرجة حموضة الوسط المستخدم لاستنباتها. وعندما تعترضنا مشاكل من هذا النوع يجب علينا إعادة عملية التلوين أو استخدام مزارع فتية للجرثوم نفسه مع الانتباه لدرجة حموضة وسط الاستنبات .

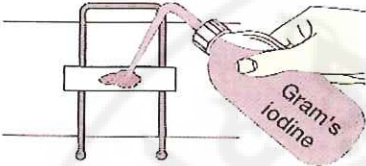
وتجدر الإشارة إلى أنه تم إجراء تعديلات عديدة على طريقة غرام الأصلية بهدف الحصول على نتائج أفضل ولكن المبدأ يبقى واحداً .



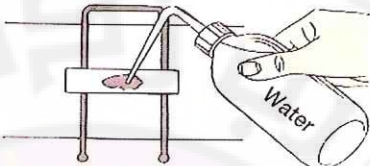
(a) ضع الكريستال البنفسجي مدة 30 ثانية



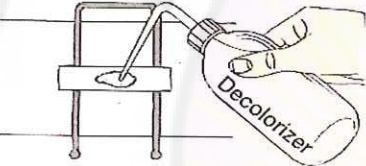
(b) اغسل بالماء مدة 5 ثوان



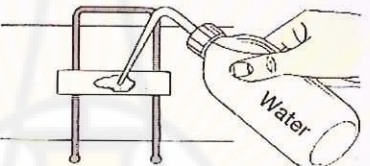
(c) ضع صبغة غرام اليودية مدة دقيقة واحدة



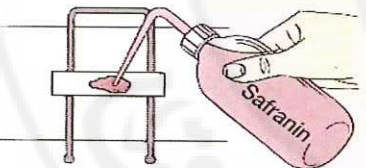
(d) اغسل بالماء مدة 5 ثوان



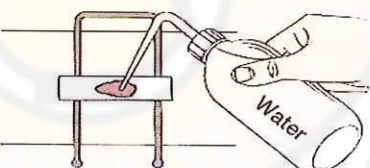
(e) ضع المذيب العضوي مدة 30-15 ثانية



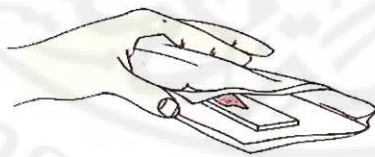
(f) اغسل بالماء مدة 5 ثوان



(g) ضع السفرانين مدة 60-80 ثانية



(h) اغسل بالماء مدة 5 ثوان



(i) جفف بورق النشاف

الشكل 61

آلية إجراء تلوين غرام

التفسير : (الشكل 62)

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

بدايةً يتم تلوين جميع الخلايا دون استثناء باللون البنفسجي ، لأن جميع الخلايا يمكنها امتصاص ملون البلورات البنفسجية ، 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 نوعين من الخلايا :
النوع الأول :

خلايا جدارها الخلوي غني بالدهون (الشحوم) حيث يملك نسبة 20% تقريباً ، هذه الشحوم تذوب بالكحول بسرعة مما يسمح للكحول بالدخول إلى داخل الخلايا ، وهذا يؤدي إلى حل المعقد المتشكل بين البلورات البنفسجية ، ومحلول لوغول وإذابته وخروجه من الخلية الجرثومية ، فتصبح هذه الخلايا عديمة اللون وتأخذ اللون الزهري عند إضافة السفرائين أو الفوكسين ، وتسمى جراثيم سالبة غرام ويرمز لها G^- .

النوع الثاني :

خلايا جدارها الخلوي فقير بالدهون (الشحوم) حيث يملك نسبة 2% تقريباً ، فلا يستطيع الكحول المرور لداخل الخلايا بسهولة و من ثم تكون كمية الكحول التي تعبر لداخل الخلايا غير كافية لحل المعقد خلال نفس الزمن من المعالجة ، مما يؤدي إلى بقاء المعقد داخل الخلايا الجرثومية و من ثم تبقى محتفظة بلون البلورات البنفسجية ، وتسمى إيجابية غرام ويرمز لها G^+ .



الشكل 62

المراحل التي تمر بها الخلايا الجرثومية عند تلوين غرام

ملاحظة : إن التلوين المعاكس لا يمس إلا الخلايا التي زال لونها بالكحول .
يعد هذا التفسير الأكثر قبولاً لتفسير آلية (ميكانيكية) تلوين غرام ولكن
هناك أكثر من تفسير لآلية تلوين غرام منها أن الجراثيم ذات الجدران الغنية

بالدهون ، الكحول يفتح بجدارها فتحات كبيرة الحجم تكفي لخروج المعقد ، أما الخلايا ذات الجدران الفقيرة بالدهون يفتح الكحول بجدارها فتحات صغيرة الحجم لا تكفي لخروج المعقد .

ملاحظة : إن الجراثيم الكهلة قد تغير من خصائصها الخلوية ، فالجراثيم موجبة غرام الكهلة تبدو أحياناً سالبة غرام .

طريقة زيل - نيلسون Ziehl - Nelson :

تستعمل هذه الطريقة لتلوين الجراثيم المقاومة للحمض Fast Stain acid وبشكل خاص لتلوين عصيات السل *Mycobacterium tuberculosis* والجدام *Leprosy* وبعض أنواع الأكتينوميست *Actinomycetaceae* التي يصعب تلوينها بالصبغات العادية بسبب احتواء جدرها على مركبات معقدة كالشموع والدهون . وتعتمد هذه الطريقة على مبدأ استخدام درجة مقاومة الجراثيم الملونة لفقدانها اللون نتيجة معاملتها بالمواد المذيلة للون كالحموض والكحول، وذلك لتقسيم الجراثيم إلى مجموعتين :

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

- الثانية : تتلون بالبداية بصعوبة حيث تحتاج إلى التسخين بوجود صبغ قوي مناسب، ولكنها تحتفظ بلونها بعد ذلك بشدة ، بشكل يصعب معه إزالة هذا اللون بالمذيب السابق . وذلك طبعاً يتوقف على طبيعة الجدار الخلوي .
الأدوات والمواد اللازمة :

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

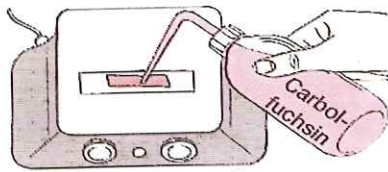
2- محاليل الصبغات التالية : محلول كربول - فوكسين (محلول زيل) - كحول حامضي - صبغة أزرق الميتلين (راجع دليل تحضير الصبغات).

3- صفائح زجاجية نظيفة .

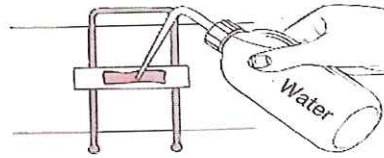
4- زيت الأرز النقي .

طريقة العمل : (الشكل 63)

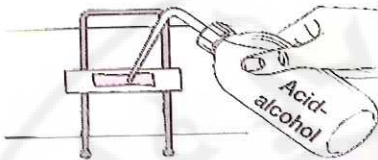
- 1- حضر الغشاء الجرثومي وثبته بالطريقة المعروفة ، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف .
- 2- اغمر الغشاء بمحلول كربول - فوكسين، وسخن بلطف فوق سخان أو فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار، أبعء اللهب قليلاً ثم كرر التسخين لعدة مرات بالطريقة نفسها لمدة خمس دقائق مع مراعاة عدم غليان الصبغة أو جفافها على الشريحة وإضافتها 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 أزرق الميثيلين مدة 1 - 2 دقيقة ، ثم اغسل 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 .



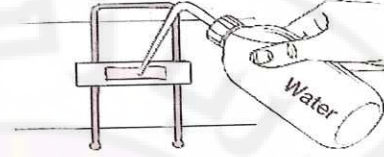
(a) ضع أنشريحة على سخان
وضع عليها كربول الفوكسين
مدة 5 دقائق



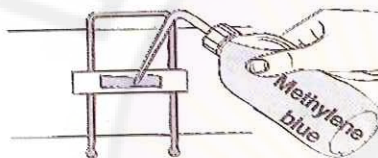
(b) اغسل بالماء لمدة 30 ثانية



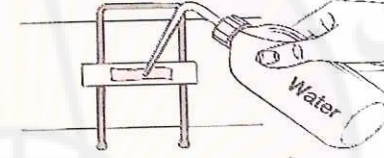
(c) ضع الكحول الحامضي
مدة 10-30 ثانية



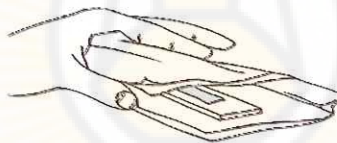
(d) اغسل بالماء لمدة 5 ثوان



(e) ضع أزرق الميثيلين
لمدة دقيقتين



(f) اغسل بالماء لمدة 30 ثانية

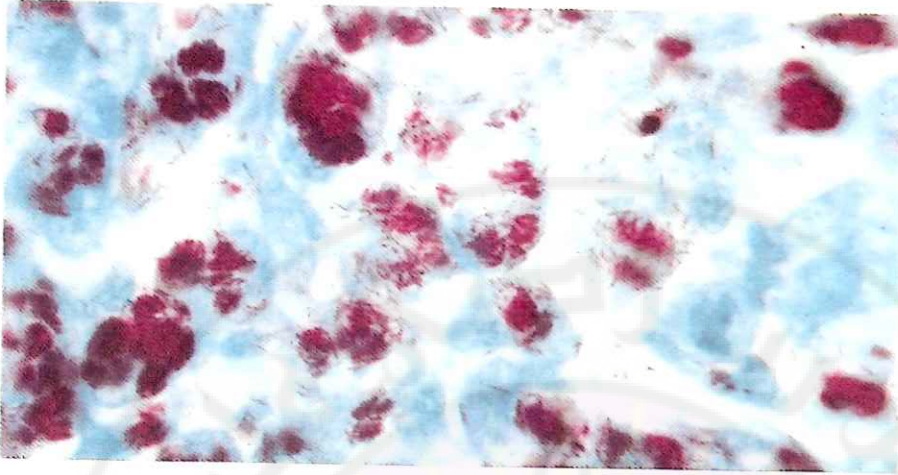


(g) جفف بورق النشاف

الشكل 63

آلية تلوين زيل - نلسون

- 8- دوّن ملاحظاتك حول التجربة (من حيث اللون - شكل الخلايا -
تجمعها) مع الرسم . (الشكل 64).



الشكل 64

خلايا السل كما تظهر بعد التلوين بطريقة زيل - نلسون
خلايا السل بلون أحمر وباقي خلايا النسيج بلون أزرق

التفسير :

عند وضع محلول كربول - فوكسين (الفوكسين القاعدي المذاب بالفينول) على الخلايا مع التسخين نكون بذلك قد قمنا بتلوين الخلايا وترسيخ اللون معاً، وهذا يؤدي 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 أزرق الميتلين تتلون فقط الجراثيم غير المقاومة للحمض والتي زال منها اللون الأحمر . وبذلك نستطيع التمييز بين نوعين من الجراثيم : الأول يأخذ اللون الأحمر بتلوين زيل - نلسون 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 .

الأدوات والمواد اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية لجراثيم لولبية إن وجدت أو يستعاض عنها بأخذ جزء من قلف الأسنان بالقرب من اللثة .
- 2- 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).
- 3- صفائح زجاجية نظيفة .
- 4- زيت الأرز النقي .

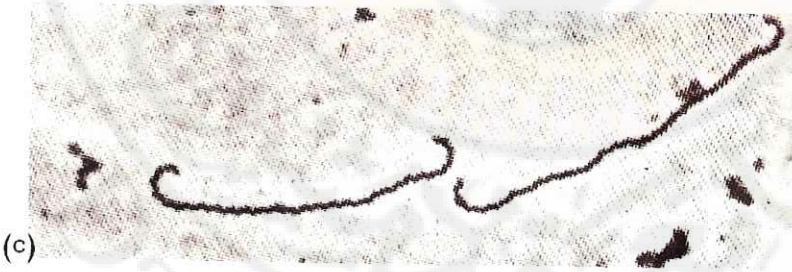
طريقة العمل :

- 1- حضر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر بتيار مائي خفيف .
- 2- اغمر الغشاء بمحلول حمض العفص، وسخن بلطف فوق اللهب حتى بدء تصاعد البخار، أبعاد اللهب قليلاً، ثم كرر التسخين لعدة مرات بالطريقة نفسها لمدة 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 لمدة نصف دقيقة ، مع مراعاة عدم الغليان والجفاف. ثم اغسل بالماء جيداً.

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

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

7- دَوِّن ملاحظاتك حول التجربة مع الرسم . (الشكل 65)



الشكل 65

صور لبعض الجراثيم اللولبية ملونة بطرق مختلفة

(a) جراثيم *Treponema pallidum* - (b) جراثيم *Borrelia duttonii* كما تبدو بدم الإنسان - (c) *Leptospira interrogans* .

طريقة غيمزا Giemsa :

تستعمل هذه الطريقة لتلوين اللطخات الدموية لدراسة الكريات الحمراء والبيضاء وأشكالها وأنواعها بالإضافة للتحري عن وجود بعض الجراثيم في الدم وخاصة البورليات .

يستخدم لذلك ملون غيمزا المحلول بالغول الميتيلي والغليسول .
(راجع دليل تحضير الصبغات) .

طريقة العمل :

- 1- اغمر لطاخة الدم بالغول الميتيلي لمدة دقيقة، ثم أمل الشريحة لإزالة الفائض من الغول الميتيلي .
 - 2- اغمر المحضر بملون غيمزا واتركه مدة 20 - 30 دقيقة .
 - 3- اغسل بالماء جيداً .
 - 4- اترك المحضر ليجف بتيار من الهواء أو جففه بورق النشاف بعناية فائقة .
 - 5- ضع قطرة من زيت الأرز على الغشاء، ثم افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً، ثم بالعدسة الغاطسة .
 - 6- دوّن ملاحظاتك حول التجربة مع الرسم .
- طريقة ورت - كونكلين أو شيفر - فلتون:

Wirtz - Conkl.in or Schaeffer- Fulton

تستخدم هذه الطريقة لتلوين الأبواغ عند الجراثيم ، حيث تعد الأبواغ الداخلية Endospores الطور الساكن لبعض الأنواع الجرثومية مثل أنواع المطثيات *Clostridium* والعصيات *Bacillus* . وتتصف الأبواغ بأنها أقل قابلية للتلون من الجراثيم بسبب جدارها السميك وكثافة محتوياتها

السيتوبلاسمية؛ لذلك تبدو بشكل 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.

كما يمكن ملاحظتها دون تلوين باستخدام مجهر الأطوار المتباينة.

الأدوات والمواد اللازمة :

1- مزارع جرثومية لأحد الأنواع المتبوعة في مرحلة التبوغ عمرها ثلاثة

أيام مثل جراثيم *B. subtilis* أو جراثيم *Clostridium*.

2- محاليل الصبغات الآتية: صبغة أخضر المالاكيت 5 % Green

Malachite ، صبغة السفرانين أو الفوكسين 0.5% . (راجع دليل

تحضير الصبغات) .

3- صفائح زجاجية نظيفة .

4- زيت الأرز النقي .

طريقة العمل : (الشكل 66)

1- حضّر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، واغسله بحذر

بتيار مائي خفيف .

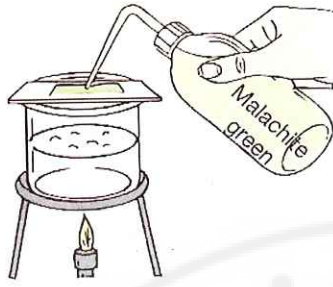
2- اغمر الغشاء بمحلول صبغة المالاكيت، وسخنه على اللهب حتى بدء

تصاعد البخار لمدة 5 دقائق مع إضافة الصبغة عند اللزوم. تجنب

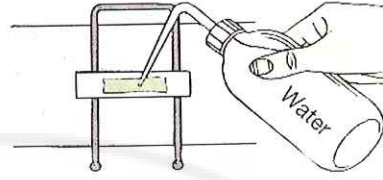
وصول المحضر إلى مرحلة الغليان، أو خذ قليلاً من الماء الغالي في

كأس، وضع فوقه قطعة من الشبك المعدني لحمل المحضر الجرثومي،

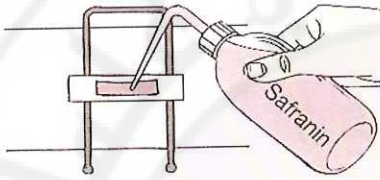
ثم اغمر الغشاء بمحلول صبغة المالاكيت مدة 5 دقائق .



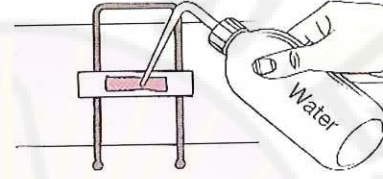
(a) ضع الشريحة فوق حمام مائي وضع عليها أخضر المالاكيت مدة 5 دقائق



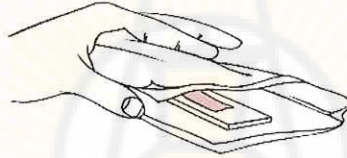
(b) اغسل بالماء لمدة 30 ثانية



(c) أضف السفرانين مدة 60-90 ثانية



(d) اغسل بالماء لمدة 30 ثانية



(e) جفف بورق التشفاف

الشكل 66

آلية تلوين الأبواغ الداخلية

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

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

5- اغسل المحضر بالماء جيداً مدة 30 ثانية .

6- اترك المحضر ليحفظ 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 . (لاحظ تلون الأبواغ باللون الأخضر المزرق والخلايا باللون الأحمر) . (الشكل 67) وحدد مكان البوغ داخل الخلية الجرثومية، وحدد حجمها بالنسبة للخلية .

ملاحظة :

يمكن إجراء تلوين الأبواغ بطريقة دورنر وتعتمد على استخدام ملون كربول - فوكسين الساخن ، ثم معاملة المحضرات بملون النيغروزين الذي يعمل كمادة مزيلة للون من جهة وكملون سلبي من جهة أخرى. فتظهر الأبواغ بلون أحمر أما الخلايا فتكون عديمة اللون فوق أرضية مظلمة. الأدوات والمواد اللازمة :

1- أنبوبا اختبار فارغان ومعقمان ، وماء معقم .

2- مزارع جرثومية لأحد الأنواع في مرحلة التبوغ عمرها

ثلاثة أيام مثل جراثيم *B. subtilis* أو جراثيم *Clostridium*.

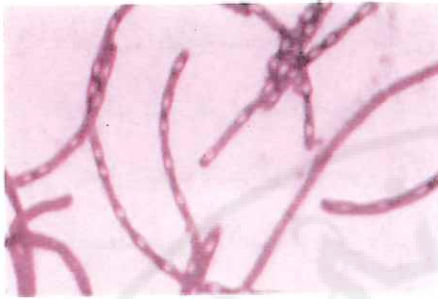
3- محاليل الصبغات التالية :

- صبغة كربول - فوكسين .

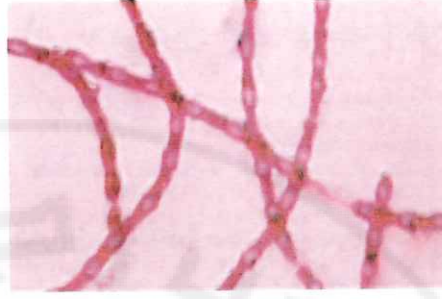
- ملون النيغروزين . (راجع دليل تحضير الصبغات).

4- صفائح زجاجية نظيفة .

5- زيت الأرز النقي .



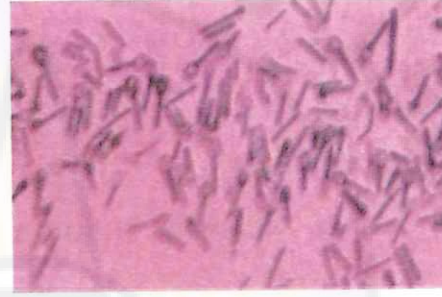
(a)



(b)



(c)



(d)

الشكل 67

صور لبعض الجراثيم المتبوعة تبدو الأبواغ بداخل الخلايا

- (a) جراثيم *Bacillus anthracis*
- (b) جراثيم *Bacillus subtilis*
- (c) جراثيم *Clostridium botulinum*
- (d) جراثيم *Clostridium tetani* .

طريقة العمل :

1- ضع خمس قطرات من الماء المعقم في أنبوبي اختبار ، وأضف إلى أحد الأنبوبين قليلاً من مزرعة جرثومية لجراثيم *Bacillus* وإلى

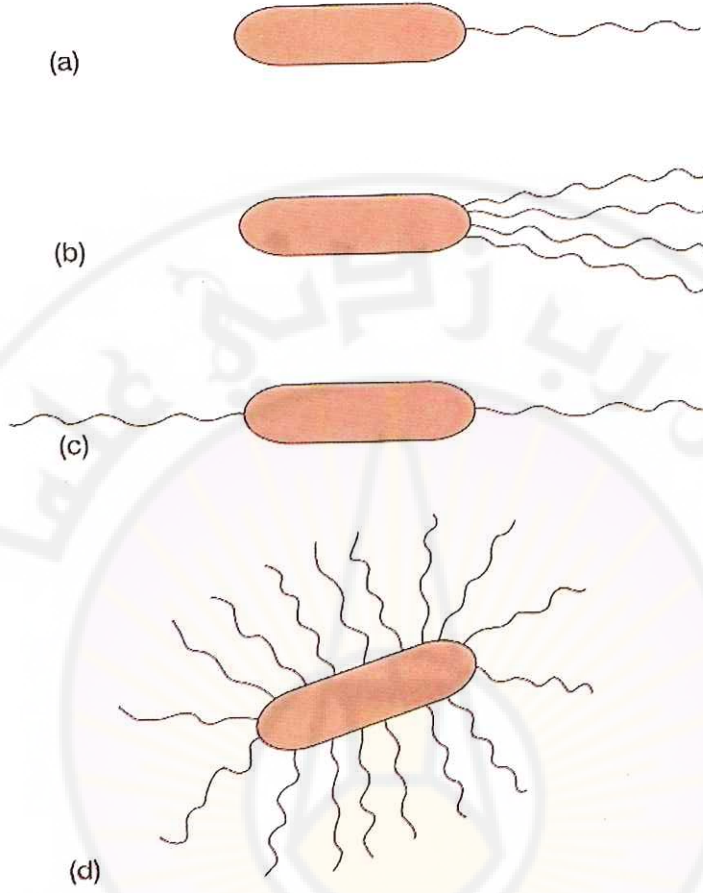
الأخر قليلاً من مزرعة جرثومية لجراثيم *Clostridium* ، لتحصل على معلق جرثومي .

- 2- أضف كمية مماثلة من ملون كربول - فوكسين لكل أنبوب، واترك الأنبوبين في حمام مائي غال لمدة 10 دقائق .
- 3- اعمل غشاء جرثومياً من الأنبوبين كلاً على حدة .
- 4- أضف ملون النيغروزين إلى المحضرين السابقين .
- 5- أزل ما تبقى من الملون، واغسله، وافحصه بالعدسة الغاطسة بالطريقة المعتادة.

6- دوّن ملاحظاتك مع الرسم .

طريقة ليفسون Leifson :

تستخدم هذه الطريقة لتلوين السياط Flagella staining عند الجراثيم المتحركة، وتختلف الجراثيم باختلاف عدد السياط ومواقعها (الشكل 68).
وبما أن السياط ذات قطر صغير (أقل من 0,2 ميكرون) لذلك لا بد من تلوينها وفحصها تحت المجهر ، وبما أنها سريعة العطب والانفصال وصعبة التلوين، لذلك تؤخذ الجراثيم من مزرعة جديد عمره من 18- 24 ساعة، وتستحلب بالماء المقطر وبلطف وبدون 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 طرق لتلوين السياط تعتمد جميعها على ترسيب الصبغة على السياط لزيادة سماكتها ورؤيتها بشكل أفضل .



الشكل 68

أماكن تواضع السياط على الخلية الجرثومية

- (a) - وحيدة السوط
(b) - حزمية السياط
(c) - قطبية السياط
(d) - محيطية السياط.

الأدوات والمواد اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة تقريباً لأنواع
Bacillus cereus أو *Pseudomonas*.

2- صبغة ليفسون لصبغ السياط . (راجع دليل تحضير الصبغات).

3- صفائح زجاجية نظيفة جداً .

4- زيت الأرز النقي .

طريقة العمل :

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

2- امسك الصفيحة بشكل مائل لتتحدّر 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، وجففه 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 :

تستخدم هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية Capsule staining. والمحفظة الجرثومية 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 طرق لإظهار المحفظة، ولكن تجدر الإشارة إلى عدم استعمال الماء مهما تكن الطريقة المستخدمة في أثناء تحضير الغشاء لأن المحفظة قابلة للذوبان به .

الأدوات والمواد اللازمة :

1- مزارع جرثومية فتية بعمر 24 ساعة لجراثيم *Klebsiella pneumoniae*.

2- محاليل الصبغات التالية: محلول صبغة الفوكسين القاعدية 30% - محلول كبريتات النحاس Cu SO_4 20% - محلول أزرق الميتلين 1% . (راجع دليل تحضير الصبغات) .

3- صفائح زجاجية نظيفة .

4- زيت الأرز النقي .

طريقة العمل :

1- حضر الغشاء الجرثومي، وثبته بالطريقة المعروفة، وتجنب غسله بالماء.

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

3- اغسل بمحلول كبريتات النحاس .

4- اغمر الغشاء بمحلول أزرق الميتلين، ثم اغسل بالماء .

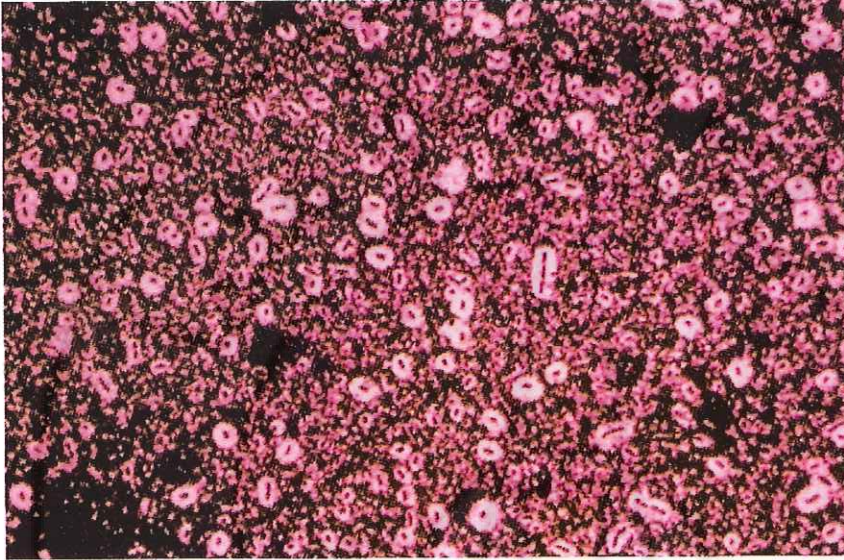
5- جفف الصفيحة بالهواء، وضع عليها قطرة من زيت الأرز، ثم افحصها تحت المجهر بالعدسة الغاطسة.

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

طريقة الحبر الصيني :

تستخدم هذه الطريقة لتلوين المحفظة الجرثومية. وهي من أبسط طرق تلوين المحفظة، ويتم ذلك بمزج قطرة من مستحلب كثيف للجرثوم مع

قطرة من الحبر الصيني أو الهندي وفرشها على صفيحة نظيفة وتركها تجف في الهواء (طريقة التلوين السلبي) . فتظهر المحفظة بشكل هالة لماعة تحيط بالخلية الجرثومية في ساحة مظلمة . (الشكل 69)



الشكل 69

المحفظة كما تبدو بعد التلوين بالحبر الهندي عند جرثوم *Klebsiella*

ولكن يدعي بعض العلماء أن مثل هذه الهالة لا تمثل المحفظة دائماً وإنما هي طبقة نشأت نتيجة بعض الظروف غير الملائمة (جفاف، برودة، حرارة مرتفعة الخ) لذلك يفضل دوماً تلوين الجراثيم ذات المحفظة الكبيرة مثل جراثيم الـ *Klebsiella pneumoniae* ثم مقارنتها بالجراثيم المراد دراستها .

الفصل العاشر

دراسة بعض خواص الجراثيم

وتحديد أنواعها

تعدُّ عملية تحديد وتمييز الأنواع الجرثومية من أهم الأمور في دراسة الأحياء الدقيقة. وهناك مخططات توضح لنا الاختبارات التي ينبغي تطبيقها والأسلوب الذي يجب إتباعه للوصول إلى النتيجة المرجوة (راجع Bergey's Manual). وتهدف هذه الاختبارات إجمالاً إلى التحري عن المعلومات الآتية للوصول إلى هوية الجرثوم :

- عزل الجراثيم واستنباتها على أوساط مناسبة .
- دراسة مدى حاجتها من الأوكسجين لكونه من أهم الغازات التي تؤثر في نموها .
- تحديد الخصائص الشكلية للجراثيم ومستعمراتها.
- تحديد سلوك الجراثيم تجاه الملونات، وخاصة ثلوين غرام .
- دراسة بعض الشروط البيئية المؤثرة في نموها .
- دراسة الخصائص الفيزيولوجية والحيوية الكيميائية .
- تحديد طريقة التغذية .
- دراسة التفاعلات المصلية والمناعية .
- دراسة التركيبات الوراثية للجراثيم (DNA - RNA).

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

العمل إلا الباحثون المتخصصون ، لذلك ونظراً لضيق الوقت فإننا سنقتصر على التعرف وإجراء عدد من الاختبارات المهمة التي تتناول جانباً قد يساعدنا في عزل بعض الأنواع الجرثومية شائعة الانتشار وتحديدتها . أي سنقوم بعرضها عرضاً مبسطاً يتناسب مع واقع الطلاب المبتدئين في هذا المجال . بمعنى آخر سنقوم بإجراء الاختبارات النوعية المناسبة التي تمكننا من تمييز المجموعات والأنواع المتقاربة بالرغم من تشابهها في كثير من الصفات والخصائص الأخرى .

ولكن يجب الأخذ بعين الاعتبار دائماً أن الاختبار التأكيدى أو الإضافى الذى يكون مفيداً جداً فى حالة معينة يمكن أن يكون عديم الفائدة فى حالة أخرى ، مثال ذلك : اختبار الكاتالاز مهم جداً للتمييز بين المكورات العنقودية إيجابية الكاتالاز ، وبين المكورات العنقودية سالبة الكاتالاز ، ولكنه غير مفيد فى التمييز بين أفراد فصيلة *Enterobacteriaceae* ففى هذه الحالة يمكن أن نلجأ إلى اختبارات أخرى مثل اختبار الاندول أو اختبار أحمر الميتيل - فوكس بروسكاوير .

وسوف نستعرض فيما يلى أهم الاختبارات المستخدمة لتمييز المجموعات الجرثومية وعزلها .

1- انتشار الأحياء الدقيقة :

وهو اختبار بسيط نجريه فى البداية لكى نبرهن على وجود الأحياء الدقيقة وانتشارها فى 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 ، و ثم إجراء تلوين غرام للتعرف على أشكال الخلايا الجرثومية وطبيعة جدارها الخلوى .

لإجراء هذا الاختبار يجب علينا تعقيم الأدوات المستخدمة في التجربة وتجنب تلوث الأوساط الغذائية وإتباع الطرق السليمة في التعقيم ، ثم نقوم بتعريض أحد الأوساط الغذائية المعقمة إلى الهواء أو رذاذ العطاس أو السعال 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.....الخ .

ثم نضع الأوساط الملقحة بالحاضنة لمدة 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 :

1- وسط غني مثل الآغار المغذي (راجع صفحة تحضير الأوساط الزرعية) معقم موجود في أطباق بتري معقمة ، أو في أنابيب بشكل مائل .

2- مسحات قطنية معقمة .

3- ماصات معقمة .

طريقة العمل :

1- دون على الأطباق المعلومات الآتية: الاسم - الفئة - نوع المعاملة وهي كالاتي :

- طبق معقم شاهد للمقارنة Sterile Control .
- هواء .
- أصابع اليد .

- تخفيف من التربة .

- ماء الصنبور .

- رذاذ العطاس .

- قلف الأسنان الخ .

2- اترك الطبق المعقم دون إضافة أي شيء، فهو شاهد يستخدم 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، ومرر 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 جزءاً من الماء بماصة معقمة، وافرشها على سطح الطبق، ثم أعد إغلاقه ثانية.

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

8- ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه قلف الأسنان ، وخذ جزءاً من قلف الأسنان بالقرب من اللثة أو بين الأسنان بوساطة مسحة قطنية معقمة،

وامسحها على سطح الوسط المغذي ، ثم أعد إغلاقه ثانية.

9- بلل مسحة قطنية معقمة بالماء المعقم، وامسحها على سطح الجدار بمساحة قدرها 2 سم²، ثم ارفع غطاء الطبق الذي كتب عليه سطح الجدار

وامسحها على سطح الوسط المغذي ، ثم أعد إغلاقه ثانية .

10- ضع جميع الأطباق بعد قلبها في الحاضنة (يفضل وضع كل طبق في كيس من البلاستيك) على درجة حرارة 37°م لمدة 24 -48 ساعة .

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

12- ادرس المستعمرات الجرثومية من حيث العدد واللون والشكل والقوام والارتفاع ... الخ وفق ما ورد في بحث صفات المزارع ونوع النمو .

13- حضر غشاء جرثومي من بعض المستعمرات النامية في الأطباق، ولونها بتلون غرام أو بملون أزرق الميتلين أو بملون ايوزينات الصوديوم، وافحصها تحت المجهر .

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

2- تحديد حاجة الجراثيم لأوكسجين الهواء :

عزل الجراثيم الهوائية واللاهوائية :

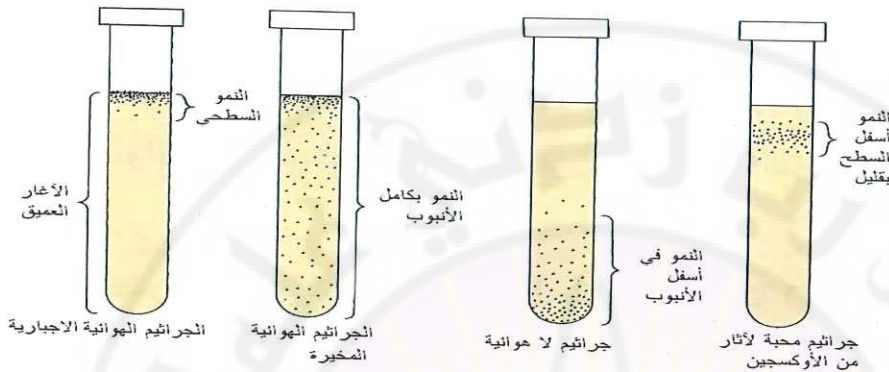
يعد الأوكسجين من أهم الغازات التي تؤثر في حياة الجراثيم ونموها، وتقسم الجراثيم تبعاً لحاجتها من الأوكسجين إلى أربعة أنواع (الشكل 70)

1- الجراثيم الهوائية Aerobic bacteria تنمو بوجود كميات كبيرة من الأوكسجين، وبعضها ينمو بوجود الأوكسجين الصرف . وهي جراثيم تحتوي على إنزيمات الأكسدة فهي غير قادرة على فعل

الاختمار، من أمثلتها *B. subtilis - Azotobacter*

2- الجراثيم اللاهوائية Anaerobic bacteria تنمو بغياب الأوكسجين حيث لا تملك الكاتالاز Catalase التي تفكك الماء الأوكسجيني

المتشكل في الخلايا إلى ماء وأوكسجين لذلك يعدُّ الأوكسجين سمّاً لها، وهي جراثيم تحصل على الطاقة اللازمة لها من عملية التخمر، من أمثلتها جنس *Clostridium* .



الشكل 70

تحديد حاجة الجراثيم للأوكسجين بطريقة المزرعة متساوية التوزيع

3- الجراثيم اللاهوائية اختياريًا Facultatively anaerobic bacteria
تستطيع النمو بوجود الأوكسجين أو بغيابه، وهي قادرة على القيام
بعمليات التخمر والتنفس معاً حسب توفر الأوكسجين. من أمثلتها الأنواع
التابعة للجنس *Escherichia*.

4- الجراثيم المحبة لآثار من الأوكسجين Microaerophilic bacteria تنمو بوجود كميات قليلة جداً من الأوكسجين وتفضل نسبة محددة من غاز ثاني أوكسيد الكربون CO_2 (5-10 %)، وتكون حساسة تجاه الكميات الكبيرة من الأوكسجين لاحتوائها على بعض إنزيمات الأكسدة فقط . من أمثلتها جنس *Lactobacillus*

- ويكفي لتنمية الجراثيم الهوائية أن تترك أنابيب الاختبار المزروعة تحت الظروف العادية لتوفير احتياجاتها من أوكسجين الهواء، أما إذا أريد الحصول على نمو أفضل، فتزداد درجة تعريض هذه المزارع إلى الأوكسجين الجوي، إما عن طريق تكبير سطح المزرعة المعرض للهواء أو عن طريق التهوية الاصطناعية لهذه المزارع.

- أما تنمية الجراثيم اللاهوائية، فيحتاج إلى طرق ومعدات خاصة للتخلص من الأوكسجين المنحل في الوسط الزراعي أو الموجود في الجو المحيط بالمزارع، وهذه الطرق قد تم ذكرها سابقاً (راجع بحث استنبات الجراثيم اللاهوائية المجبرة) .

الأدوات والمواد اللازمة :

- 1- عدد من أنابيب آغار غلوكوز (راجع دليل تحضير الأوساط الزراعية) بالشكل العميق .
- 2- إبر تلقيح جرثومية مستقيمة للوخز .
- 3- مزارع جرثومية لأنواع مختلفة مثل :

B. subtilis – *Clostridium sporogenes* – *Lactobacillus lactica* – *E.coli*

4- معلق ترربة .

5- حمام مائي .

طريقة العمل :

- 1- اغمس إيبرة التلقيح المستقيمة بعد عملية تعقيمها وتبريدها في المعلق المائي للترربة أو في أحد المزارع الجرثومية السابقة .
- 2- لقح الأنابيب السابقة بواحد من هذه الجراثيم كلاً على التوالي بطريقة اللوخز، دون اسمك واسم الجرثوم على جميع الأدوات المستعملة .

- 3- اصهر أنابيب أخرى تحوي الوسط في حمام مائي، وبرده حتى الدرجة 45°م، ثم لَقِّح كل أنبوب بأحد الجراثيم السابقة أو بمعلق التربة بطريقة المزرعة المهتزة (متساوية التوزيع) ثم حرك الأنابيب بين راحتي اليد ليتوزع الجرثوم جيداً ، واترك الأنابيب لتجمد بالوضع القائم .
- 4- احضن الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 2-3 أيام .
- 5- افحص الأنابيب ولاحظ النمو في كل من الطريقتين .
- 6- دوّن ملاحظاتك مع الرسم .

3- تأثير درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم :

تؤثر درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم ، فهي تحدد سرعة نموها ومقدار نموها الكلي كما تؤثر في العمليات الاستقلابية وفي شكل الخلايا الجرثومية. هذا ويتميز كل نوع جرثومي بدرجة حرارة دنيا ومثلى وعظمى . وتبعاً لذلك تقسم الجراثيم إلى :

- 1- جراثيم محبة للبرودة Psychrophiles تتميز بقدرتها على النمو في درجة حرارة الصفر المئوية أو أقل من ذلك أو أكثر بقليل ، ولكن الدرجة المثالية لنموها هي بين 15-20°م .
- 2- جراثيم محبة للحرارة المعتدلة Mesophiles يكون نموها الأفضل بين درجة الحرارة 25-40°م .
- 3- جراثيم محبة للحرارة المرتفعة Thermophiles يكون النمو الأفضل لهذه الجراثيم بين 45 - 60°م، وتقسم هذه الجراثيم إلى قسمين :

- جراثيم محبة للحرارة المرتفعة اختياريّاً Facultative thermophiles

- جراثيم محبة للحرارة المرتفعة إجبارياً Obligate thermophiles وهي التي لا يمكن أن تعيش إلا في الحرارة العالية نحو 60°م ، مثال جراثيم الينابيع الكبريتية .

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

وأخيراً يجب أن ننوه إلى أن درجات الحرارة المنخفضة لا تقتل الجراثيم، وإنما هي بشكل عام تؤمن لمعظم الجراثيم الحفاظ على حياتها، حيث تتوقف الخلية الجرثومية عن القيام بنشاطاتها الاستقلابية ، ولكنها تعود لنشاطها الطبيعي في حال توفر درجة الحرارة والبيئة الملائمين. أما درجات الحرارة المرتفعة التي تتعدى درجات الحرارة الملائمة للنمو فإنها تمنع الجراثيم عن النمو والتكاثر أولاً، ثم تقضي على حياتها .

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 بسيط، مبدؤه حضن المستعمرة الجرثومية المراد تحديد درجة حرارتها المثلى بدرجات حرارة مختلفة، ومن ثم تقدير أي من هذه الدرجات أفضل للنمو .

الأدوات والمواد اللازمة :

1- مزارع جرثومية لكل من الأنواع الآتية: *B. subtilis* - *E. coli* - *Serratia marcescens* وغيرها .

2- أنابيب آغار مغذٍ مائل معقمة (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

3- إبر تلقيح جرثومية .

4- حاضنات على درجات حرارة مختلفة : 25°م ، 37°م ، 55°م.

5- ثلاجة بدرجة حرارة 5°م .

طريقة العمل :

1- لقح أربعة أنابيب آغار مائل من كل مزرعة جرثومية . دون

على جميع الأنابيب اسمك واسم الجرثوم 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 لمدة أسبوع بالعين

المجردة، ولاحظ معدل النمو وتكوين الألوان بالنسبة لبعض الجراثيم.

4- دوّن النتيجة في جدول كالآتي :

جدول رقم 4

نوع الجرثوم	معدل النمو على درجة الحرارة			
	5°م	25°م	37°م	55°م
<i>E . Coli</i>				
<i>B . subtilis</i>				
<i>Clostridium</i>				

5- عبّر عن النتيجة كما يلي : - 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 :

1- معلق جرثومي لجراثيم مختلفة مثل :

. *E. Coli* – *B. subtilis* – *Staph.aureus*

2- إبرة زرع جرثومية ذات العقدة .

3- ماصات معقمة .

4- حمام مائي .

5- ميزان حرارة .

6- أنابيب آغار مغذٍ مائل معقمة ، أو أطباق بتري تحوي على
الآغار المغذي المعقم. (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

طريقة العمل :

1- حضّر المعلق الجرثومي المطلوب في أنبوبة تحوي 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. واعتبره شاهداً. دون اسمك واسم الجرثوم وتاريخ الزرع
على كل الأدوات المستعملة .

2- جهّز حمام مائي 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 به 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، كالسابق .

4- كرّر العملية السابقة عند درجة الحرارة 55°م و 60°م و 65°م و 70°م .

5- ضع الأنابيب و الأطباق (بالوضع المقلوب) بالحاضنة على درجة حرارة 37°م ولمدة 48 ساعة ، ثم لمدة أسبوع .

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

7- دوّن النتائج في جدول كالآتي :

جدول رقم 5

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

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

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

4- تأثير درجة pH في نمو الجراثيم :

تؤثر درجة حموضة الوسط في نمو الجراثيم ، ويتميز كل نوع جرثومي بدرجة pH مثالية يبلغ فيها نشاط الجرثوم الفيزيولوجي حده الأعظمي. وكثيراً ما تضاف للأوساط الزرعية المختلفة مواد واقية (منظمة) Buffer solutions مثل أملاح الفوسفات والكربونات وأحياناً البروتينات لتحافظ قدر الإمكان على قيمة ثابتة لدرجة pH. لأن نمو الجراثيم في الوسط يؤدي إلى تغير في درجة pH ، وعموماً تفضل معظم الجراثيم درجات pH المعتدلة والتي تتراوح بين 6.5 - 7.5 ، ولكن بعض الجراثيم كضمات الهيضة *Vibrio comma* تفضل وسطاً قلويّاً pH = 8 ، والعصيات اللبنية *Lactobacillus* تفضل وسطاً حامضياً PH = 4 ، لذلك نسميها جراثيم محبة للحموضة. ويمكن القول بأن درجة الـ pH الدنيا والقصى للجراثيم تتراوح بين 4 - 9 .

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

الأدوات والمواد اللازمة :

1- مزارع جرثومية مختلفة .

2- إبر تلقيح جرثومية .

3- أنابيب اختبار معقمة تحتوي على المرق المغذي (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المحضر بدرجات حموضة مختلفة مثلاً (3- 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9) حيث يحمض الوسط بإضافة حمض عضوي مثل حمض اللبن أو حمض العنب (حمض الطرطريك) أو حمض الليمون، أما جعل الوسط قلويًا فيكون بإضافة كربونات الصوديوم .

طريقة العمل :

- 1- لَقِّح أنابيب المرق المغذي متباينة الحموضة بالجرثوم المراد دراسته. دون اسمك واسم الجرثوم وتاريخ الزرع على جميع الأدوات المستعملة .
- 2- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة لمدة يومين، ثم لمدة أسبوع .
- 3- اقرأ النتيجة حسب ظهور العكر في الوسط ، حيث يتناسب عدد الخلايا النامية طردياً مع درجة العكر . وإن أفضل درجة pH هي عند أعلى درجة عكارة في الأنابيب السابقة .
- 4- دوّن 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 والمضادات الحيوية تؤثر في النمو الجرثومي، وتستخدم عادة للقضاء على الجراثيم، ويختلف هذا التأثير باختلاف الجرثوم من ناحية اختلاف المادة المستخدمة من ناحية أخرى، وقد يكون هذا التأثير مثبطاً للنمو Bacteriostatic مثال بعض الأصبغة أو قاتلاً للجرثوم Bactericidal مثال الهالوجينات ومشتقاتها، والحقيقة إن التمييز بين الحالتين ليس سهلاً بسبب تداخلها أحياناً. والمهم بالأمر أن بعضاً من هذه

المواد له تأثير نوعي على بعض الجراثيم ، ويمكن الاستفادة من هذه الخاصة بإضافتها للمستنبات الزرعية الجرثومية لعزل بعض الجراثيم التي لا تتأثر بها، وهذا هو مبدأ المستنبات الزرعية الاصطفائية، مثال المستنبت المضاف إليه البنسلين لعزل الأنواع المقاومة مثل المستدميات، والمستنبت المضاف له البلورات البنفسجية لعزل الجراثيم سالبة غرام . وهذا ما يحتم علينا دراستها بغية السيطرة عليها وإيقاف نمو الجراثيم الضارة منها وخاصة إذا كانت ممرضة .

أ-تأثير المضادات الحيوية :

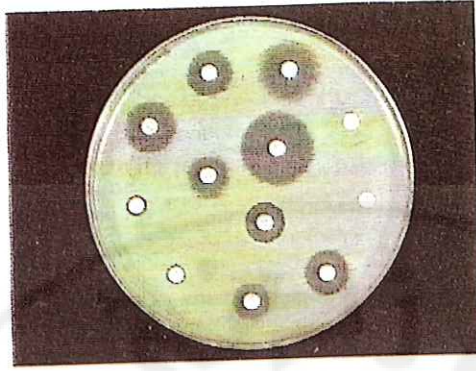
يمكن إجراء مثل هذا الاختبار وفق ما يلي :

الأدوات والمواد اللازمة :

- 1- أطباق بتري فارغة ومعقمة .
 - 2- وسط الآغار المغذي (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المعقم والمصهور بدرجة حرارة 45° م .
 - 3- أقراص من مضادات حيوية مختلفة (ديسكات التحسس أو أقراص التحسس) أو أقراص لمزارع فطرية مختلفة عمرها من أسبوع إلى عشرة أيام .
 - 4- ملقط معقم لالتقاط الأقراص- مسبر خاص لأخذ أقراص المزارع الفطرية .
 - 5- إبر زرع جرثومية .
 - 6- مزارع جرثومية أو معلقات جرثومية لأنواع مختلفة عمرها من 24 - 48 ساعة .
- ##### طريقة العمل :

- 1- وزع الآغار المصهور على أطباق بتري (نحو 20 مل في كل طبق) واطرقها تبرد وتتصلب .

- 2- اكتب على الأطباق الاسم والفئة واسم الجرثوم المراد استعماله، واسم المضاد 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 وهي كالتالي: صب جزءاً من المعلق الجرثومي على الوسط المغذي المصهور بدرجة الحرارة 45°م، ووزعه جيداً بداخله، ثم وقبل أن يتصلب الوسط، وزعه على أطباق بتري، واتركه ليتصلب ، تكون بذلك حصلت على وسط مغذي متساوي التوزيع بالنسبة للجرثوم .
- 5- خذ بوساطة الملقط المعقم (بعد تمريره على اللهب وتبريده) قرصاً من أقراص المضادات الحيوية المتنوعة (الشكل 71)، وأخذ بوساطة المسبر الخاص قرصاً دائرياً من مزرعة الفطر (الشكل 72)، 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 الجرثوم عند الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة .
- 7- لاحظ نمو الجراثيم في كامل الطبق، وفتش عن وجود هالة شفافة خالية من النمو الجرثومي حول أقراص المضادات الحيوية Zone of inhibition ، أو حول أقراص الفطر، إن وجود مثل هذه الهالات الشفافة من عدم النمو يعني أن الجرثوم قد تأثر بهذا المضاد الحيوي أو الفطر ، أو بمعنى آخر إن المضاد الحيوي أو الفطر قد ثبت نمو الجرثوم.
- 8- دون ملاحظاتك مع الرسم .



الشكل 71

الهالات الشفافة حول أقراص الصادات



الشكل 72

شكل يوضح عمل فطر البنسيليوم كمثبط جرثومي Bacteriocidal . حيث تفرز مستعمرة البنسيليوم *Penicilium* المضاد الحيوي المعروف (البنسلين) الذي يقتل خلايا جراثيم *Staphylococcus aureus* الموجودة قربها بشكل مخطط .
ب- تأثير المواد الكيميائية السامة :

اتبع نفس خطوات الاختبار السابق ولكن بدلاً من أن تستخدم أقراص المضادات الحيوية، استخدم أقراصاً من ورق الترشيح مشربة بإحدى

المواد الكيميائية السامة بتركيز مناسبة مثل: البلورات البنفسجية أو الماء الأوكسجيني أو اليود أو الكحول ... الخ (راجع بحث المطهرات) .

- يمكنك عمل حفرة في الوسط المغذي وصب كمية من المادة الكيميائية المراد اختبارها في هذه الحفرة (بدلاً من وضع القرص المشرب بالمادة) ومن ثم تحضن، ولكن بالوضع الصحيح غير المقلوب كي لا تنسكب المادة الكيميائية المستخدمة .

- يمكنك دراسة أثر الكحول في الجراثيم بإجراء الاختبار البسيط التالي :

الأدوات والمواد اللازمة :

- أنابيب اختبار فارغة معقمة .
- مزارع جرثومية مختلفة .
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- كحول إيثيلي بتركيز مختلفة 60% - 70% - 80% - 95% - كحول مطلق .
- أطباق بتري تحوي 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، ومن 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 يلي : اسمك - الفئة - اسم الجرثوم المستعمل - تركيز الكحول المستعمل .
 - 5- انقل كميات متساوية من معلق الجرثوم في الكحولات المختلفة إلى أطباق الوسط المغذي، وافرشها جيداً على سطحه .
 - 6- احضن بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 - 48 ساعة .
 - 7- اقرأ النتائج بعد المستعمرات الجرثومية النامية في الأطباق لكل تركيز من الكحول .
 - 8- دون النتائج، وقارنها، واستنتج أفضل تركيز للكحول تأثر به الجرثوم.
- 6- دراسة الخصائص الحيوية الكيميائية للجراثيم :
- كما هو معروف تعد هذه الخصائص مهمة جداً في تحديد هوية الجرثوم على مستوى الجنس والنوع الجرثومي، وقد ذكرنا سابقاً بأنه هناك اختبارات تعتبر مهمة لمجموعة جرثومية دون الأخرى .
- وسنستعرض عدداً من هذه الاختبارات الأكثر استخداماً في تحديد هوية الجراثيم الأكثر انتشاراً ، وسنكتفي بطريقة إجراء هذه الاختبارات وتحديد النتيجة دون التعرض لتشخيص هوية الجرثوم .
- أولاً : اختبارات استقلاب السكريات :
- أ- اختبار تخمر السكريات بالجراثيم :
- يعد هذا الاختبار من الاختبارات الهامة في التعرف على 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 السكاكر نفسها منتجة حمضاً فقط دون الغاز ، وعادة يكون الغاز المنتج هو CO_2 و H_2 .

ولإجراء الاختبار نكتفي بزراعة الجرثوم على وسط سائل وهو الماء الهضموني المضاف إليه أحد أنواع السكاكر 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 درجة pH بسبب تشكيل الحمض وتغير لون المشعر الموجود، كما أن استخدام أنابيب درهام Durham (وهو أنبوب صغير يوضع بداخل أنبوب الاختبار) بشكل منكس أمر ضروري لاختبار انطلاق الغاز، فإذا انطلق الغاز فإنه سيتجمع بشكل 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 كان الجرثوم يخمر السكريات دون إطلاق غاز فإننا لا نلاحظ أية فقاعات أو تغير في وضع الأنبوب الصغير .

الأدوات والمواد اللازمة :

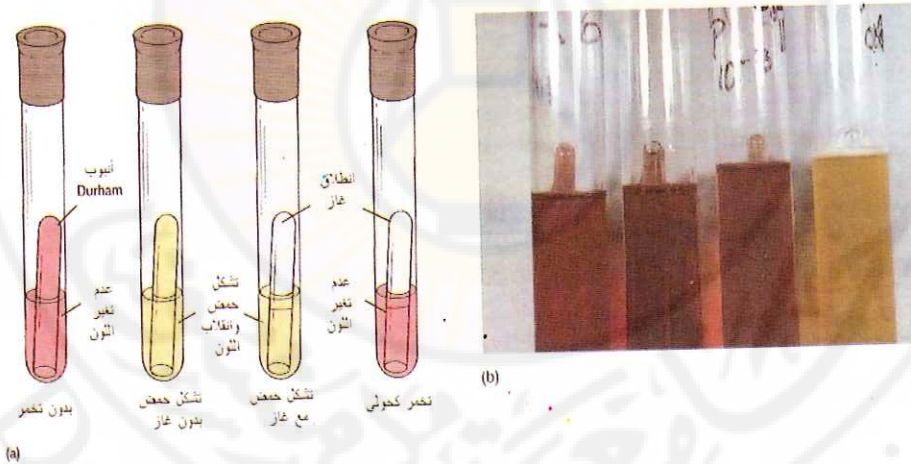
1- أنابيب اختبار تحوي وسط الماء الهضموني (راجع دليل تحضير الأوساط الزراعية) المضاف إليه السكر المراد دراسته (الغلوكوز أو اللاكتوز أو السكروز أو المالتوز أو الدكسترين الخ) والمشعر، مع وضع أنبوب دورهام بداخله بالشكل المنكس، على أن تكون جميع الأنابيب معقمة مع ما بداخلها .

2- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .

3- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك- الفئة - اسم الجرثوم- 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 للتجربة.
- 3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 - 48 ساعة .
- 4- اقرأ النتائج بملاحظة تكوين الحمض بتغير لون المشعر (من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر في حال استخدام مشعر أزرق البروم تيمول - ومن اللون الأحمر إلى اللون الأصفر في حال استخدام مشعر حمرة الفينول). أما بقاء اللون على حاله يعني عدم تكوين الحمض ومن ثمّ عدم تخمر السكر. (شكل 73).
- 5- لاحظ إنتاج غاز أو عدم إنتاجه من وجود الفقاعات في أنبوبة درهام.



الشكل 73

اختمار السكريات

6- دون النتائج في جدول كالآتي: (جدول رقم 6) ضع إشارة + للاختبار الموجب وإشارة - للاختبار السالب.

جدول رقم 6

نوع الجرثوم	غلوكونز		لاكتوز		سكاروز		مالتوز		دكسترين	
	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز	حمض	غاز
<i>E.Coli</i>										
<i>B.subtilis</i>										
<i>Staphylococcus</i>										

ملاحظة :

في حال عدم توفر أنابيب دورهام يمكن صب طبقة من الفاسبار Vaspar (مزيج متساوي الحجم من الفازلين والبارافين المصهورين معاً) بسماكة 2/1 - 1 سم فوق سطح أنابيب الاختبار بعد تلقيحها بالجرثوم، وتركها حتى تتصلب ثم نحضنها ، ونراقب انطلاق الغاز عن طريق انزلاق طبقة الفاسبار إلى الأعلى وتجمع الغاز أسفلها .

ب- اختبار أحمر الميثيل - فوكس بروسكاوير (Voges - Proskauer) :
يعدُّ هذان الاختباران هامين في تمييز العصيات سالبة غرام كالعصيات القولونية وأيضاً في تمييز أنواع الباسيلوس *Bacillus* ، والغاية من هذين الاختبارين هو دراسة طريقة تفكك الغلوكونز بالجراثيم المختلفة. حيث تحول بعض هذه الجراثيم المركبات الاستقلابية الانتقالية في عملية تخمر الغلوكونز (مرحلة تخمر حمض الفورميك Fomeric acid) إلى مركبات معتدلة بالإضافة لـ CO_2 عوضاً عن الحموض، ويعدُّ مركب أستيل ميثيل كاربينول (الأسيتونين) $CH_3 - CO - CHOH - CH_3$ من النواتج المعتدلة التي تنتج عن هذه العملية التي يسهل الكشف عنها بتطبيق اختبار فوكس بروسكاوير .

أما اختبار أحمر الميثيل فيكشف عن الجراثيم التي لا تحول النواتج الحمضية إلى نواتج معتدلة وبالتالي فإن ذلك يؤدي إلى خفض قيمة pH أكثر بكثير منه في حالة الجراثيم المنتجة لمواد معتدلة .

المواد والأدوات اللازمة :

- أنابيب اختبار حاوية على وسط كلارك - لوبس Clark - Lubs

المعقم والمكون من ماء هضموني وغلوكوز ووقاء فوسفاتي (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .

- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .

- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .

- محلول البوتاس الكاوي 16 % إلى 40 % المحتوي على 0.3 % من الكرياتين .

- محلول ألفا نفтол (محلول كحولي بتركيز 5% أو 6%) .

- مشعر أحمر الميثيل (راجع دليل تحضير الكواشف والمشعرات) .

طريقة العمل :

1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .

2- لّح أنابيب الاختبار السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك .

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 5 - 7 أيام، وبعد

فترة الحضانة المناسبة اكشف عن مادة الأسيتوئين والحمض وفق ما يلي :

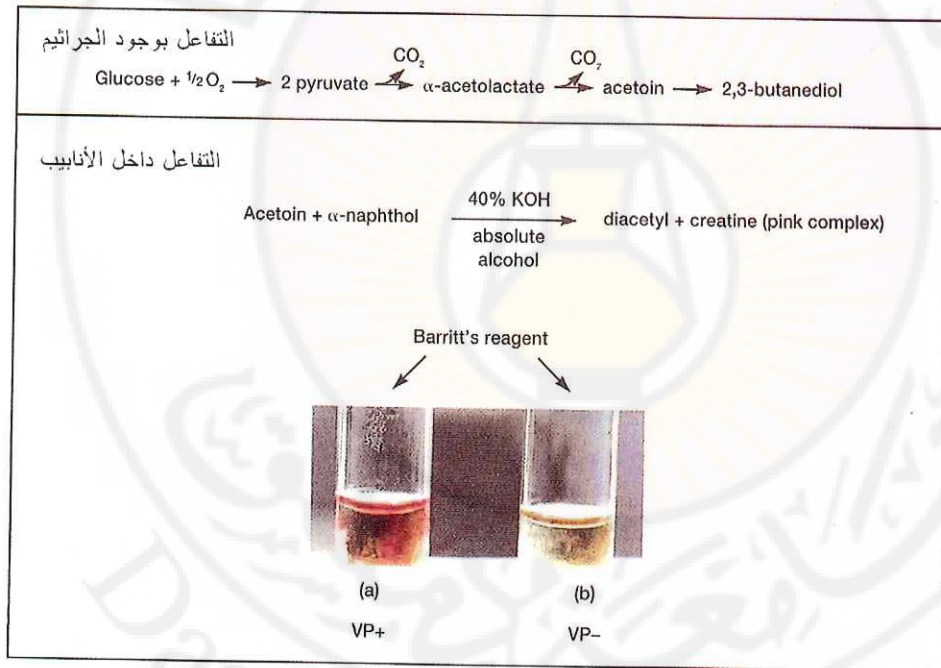
- اختبار فوكس - بروسكاوير (V.P) : (شكل 74)

أضف لمزروع الجرثوم 2/1 مل من محلول البوتاس الكاوي 16 % إلى 40 % المحتوي على 0.3 % من الكرياتين .

ثم أضف لمزروع الجرثوم نفسه نحو 2/1 مل (8 - 10 قطرات) من محلول الفانفتول . يتأكسد الأستيل ميتيل كاربونيل ويتحول إلى دي أسيتيل

ميثيل كاربونيل في وسط قلوي من البوتاس ويتفاعل مع الكرياتين ليغطي لوناً أحمر بوجود الألفا نفتول دليل الايجابية أي دليل وجود مادة الأسيتوئين، أما في حال عدم تغير اللون فإن التفاعل سلبي أي لا توجد مادة الأسيتوئين .
ملاحظة : يجب أن يكون عمر المستعمرة خمسة أيام على الأقل .

- إن ظهور لون أحمر مميزاً خلال خمس دقائق هو دليل إيجابية التفاعل، بينما ظهور لون نحاسي ليس دليلاً على إيجابية التفاعل، وإن ظهور نتيجة التفاعل يحتاج إلى نصف ساعة على الأكثر .
- من الجراثيم إيجابية فوكس - بروسكاوير جرثوم *Klebsiella* .
- من الجراثيم سالبة فوكس - بروسكاوير جرثوم *E. coli* .



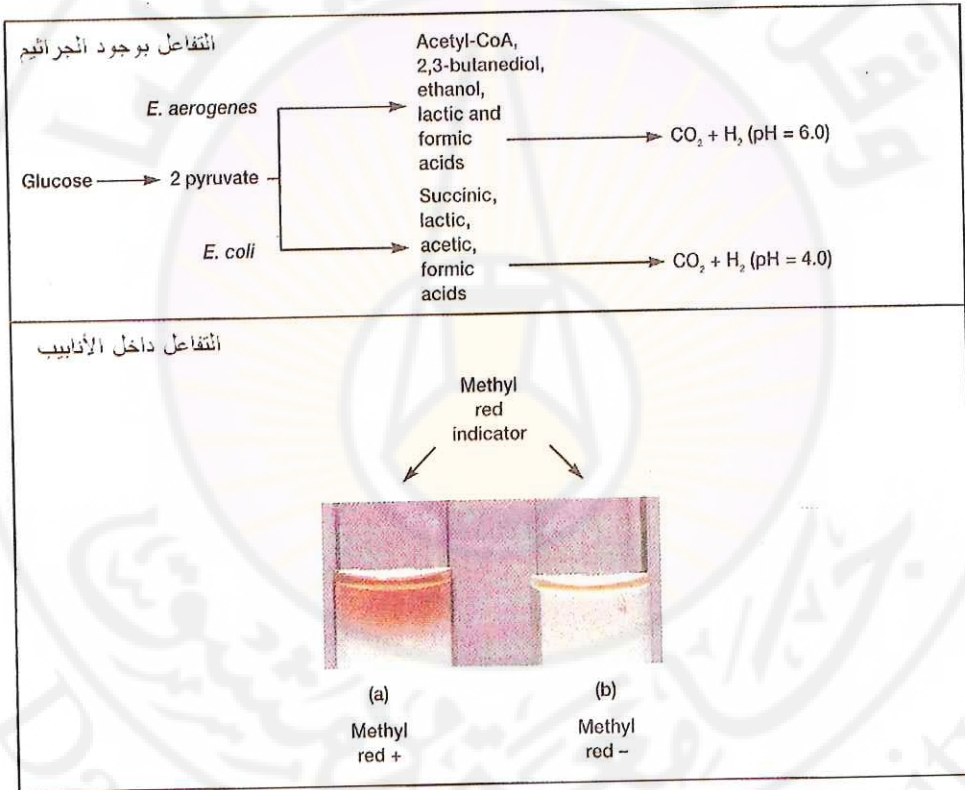
الشكل 74

اختبار فوكس - بروسكاوير

- اختبار أحمر الميثيل : (شكل 75)

أضف عدة قطرات من محلول كحولي لأحمر الميثيل إلى الأنابيب المزروعة بالجرثوم المدروس، إن ظهور اللون الأحمر يدل على نتيجة ايجابية بينما يدل اللون الأصفر على نتيجة سلبية .
ملاحظة : يجب أن يكون عمر المستعمرة 48 ساعة على الأقل.

- من الجراثيم ايجابية اختبار أحمر الميثيل جرثوم *E. coli* .
- من الجراثيم سالبة اختبار أحمر الميثيل جرثوم *Klebsiella* .



الشكل 75

اختبار أحمر الميثيل

ج - اختبار هاجنا - كليغلر Hajna - kligler :

يستخدم هذا الوسط عادة للتفريق بين أفراد عائلة Enterobacteriaceae وتحديد هويتها، كما يستخدم للتفريق بين فصيلة Enterobacteriaceae وباقي المعويات العصوية سالبة الغرام .

ويدرس هذا الاختبار قابلية استقلاب السكاكر (الغلوكوز واللاكتوز) وإطلاق غاز كما يدرس إطلاق غاز H_2S . يستخدم لهذا الاختبار وسط كليغلر الحاوي على 1% لاکتوز و 0.1% غلوكوز بالإضافة لمشعر حمرة الفينول لتحسس درجة الـ pH ، وكبريتات الحديد لدراسة انطلاق غاز H_2S .

يوزع عادة الوسط في أنابيب بحيث يكون في الأنبوب الواحد قسم مائل في أعلى الأنبوب، وقسم قائم (آغار عميق) في أسفل الأنبوب. يلحق القسم المائل من الآغار بالتخطيط ويلحق القسم العميق من الآغار بالوخز. الأدوات والمواد اللازمة :

- أنابيب اختبار تحوي على وسط كليغلر (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) المعقم والحاوي على القسم المائل والقائم .
- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة ، وإبر تلقيح مستقيمة للوخز .

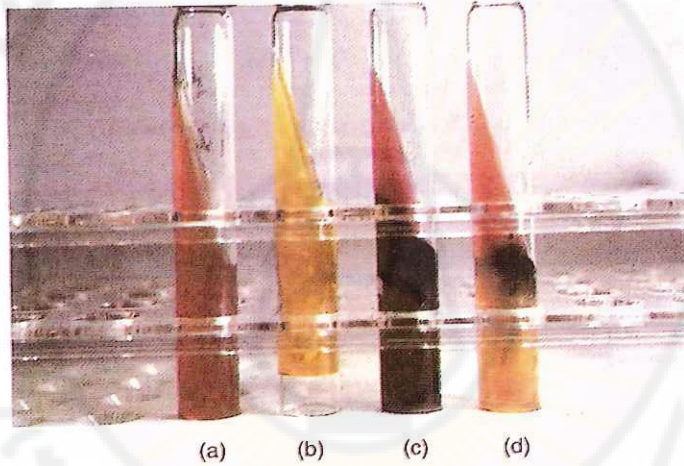
طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقم أنابيب الاختبار بالجراثيم المراد دراستها، بالوخز للجزء العميق وبالتخطيط للجزء المائل، واترك أنبوبة واحدة شاهداً سلبياً للتجربة .
- 3 - ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة $37^{\circ}C$ لمدة 18 - 24 ساعة .
- 4 - اقرأ النتائج وفق ما يلي : (الشكل 76) .

- إذا بقي لون الآغار القائم في أسفل الأنبوب أحمر ولم يتغير اللون، معنى ذلك أن الغلوكوز لم يتخمر، أما إذا أصبح أصفرَ فمعنى ذلك أن الغلوكوز قد تخمر .

- إذا بقي لون الآغار المائل في أعلى الأنبوب أحمر ولم يتغير اللون، معنى ذلك أن اللاكتوز لم يستقلب ، أما إذا أصبح أصفرَ فمعنى ذلك أن اللاكتوز قد استقلب .

- إذا أصبح كامل لون الأنبوب أصفرَ ، فإن اللاكتوز والغلوكوز قد استقلبا . أما إذا لم يتغير لون الأنبوب، فالغلوكوز واللاكتوز لم يتم استقلابهما .



الشكل 76

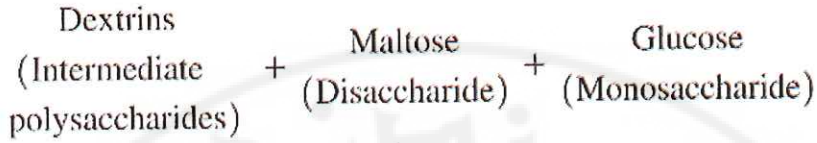
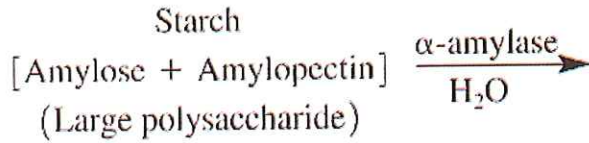
اختبار كليغلر Kligler

(a) شاهد سلبي - (b) انقلاب اللون بالأعلى والأسفل أي تخمر الغلوكوز واللاكتوز معاً ، بالإضافة لوجود غاز ، وعدم انطلاق غاز H_2S - (c) عدم انقلاب اللون يعني عدم حدوث التخمر ، ظهور اللون الأسود يعني إنتاج H_2S ، عدم انطلاق غاز - (d) انقلاب اللون بالأسفل يعني تخمر سكر الغلوكوز، وعدم انقلاب اللون بالأعلى يعني عدم تخمر اللاكتوز ، عدم انطلاق غاز ، إنتاج H_2S .

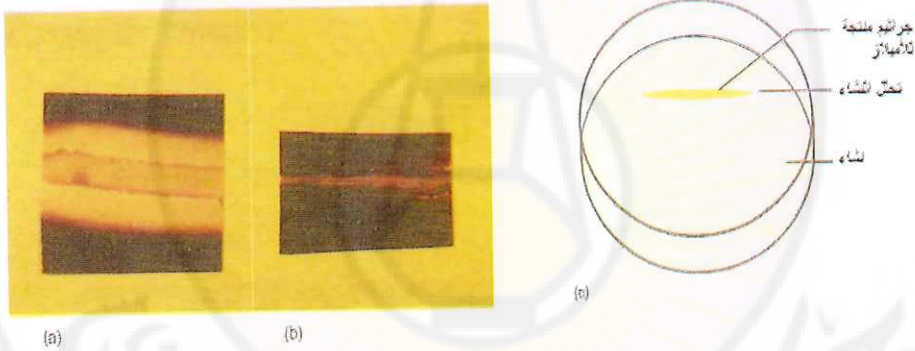
- انطلاق H_2S يترافق بتلون الوسط باللون الأسود في المنطقة الواقعة في منتصف الأنبوب فقط ، أما إذا كانت كمية H_2S كبيرة فيتلون كامل الأنبوب باللون الأسود ، لتحوّل كبريتات الحديد إلى كبريت الحديد الأسود .
هناك اختبار آخر شبيه باختبار كليفلر وله نفس الاستخدام تقريباً ، لكنه أكثر تعقيداً منه ، هو اختبار ثلاثي السكر والحديد Triple Sugar Iron Agar Test (TSI) ، ويحتوي وسط هذا الاختبار ثلاثة سكريات هي 1% لاكتوز و 1% سكاروز و 0,1% غلوكوز ، بالإضافة لكبريتات الحديد . (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .

د - اختبار تحلل النشاء (اختبار الأميلاز Amylase) :

يعد جزئ النشاء كبيراً جداً ولا يمكن أن يعبر إلى داخل الخلية الجرثومية، لذلك تفرز بعض الجراثيم إنزيمات خارجية Exoenzymes تقوم بتحطيم النشاء إلى وحدات صغيرة يمكن أن تستخدم من قبل الخلية الجرثومية، ومن هذه الإنزيمات نذكر Oligo-1.6-galactosidase و α -amylase والمعروف أن جزيئة النشاء تتألف من مركبين هما الأميلوز Amylose وهو سكر غلوكوز متعدد الجزيئة (200-300 وحدة) غير متفرع والأميلوبكتين Amylopectin وهو سكر متعدد الجزيئة ضخم ومتفرع .
وعند حلمة هذين المركبين بفعل الإنزيمات المنتجة من قبل الجراثيم تتحول إلى الدكستريين والمالتوز والغلوكوز القابلين للامتصاص من قبل الخلايا الجرثومية ، وفق التفاعل التالي :



ويمكن استخدام 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 (شكل 77).



الشكل 77

- (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 وذلك تبعاً لتركيز وكمية اليود المضاف .

ملاحظة :

إذا كانت النتيجة صعبة القراءة بسبب ظهور لون بني محمر سببه جزيئات اليود غير المتفاعلة، يمكن استخدام وسيلة بديلة، وهي : نقلب طبق بتري الحاوي على الجرثوم المراد اختباره- بعد رفع الغطاء عنه- على حامل أو طبق كبير يحوي بللورات اليود ومن ثمّ فإنّ الأبخرة المتصاعدة سوف تتفاعل مع النشاء دون أن يتمّ إعاقة القراءة بسبب ظهور اللون البني المحمر الناتج عن جزيئات اليود غير المتفاعلة .

ملاحظة :

في حال أعطى الجرثوم لوناً بنفسجياً محمراً بإضافة اليود (حل جزئي للنشاء) يجب إعادة الاختبار بعد فترة حضن إضافية .
المواد والأدوات اللازمة :

- 1- أطباق بتري حاوية على وسط آغار النشاء Starch agar المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .
- 2- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 -48 ساعة .
- 3- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 4- صبغة الغرام اليودية (محلول لوغول) .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك على شكل خطوط متباعدة .
- 3- ضع الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 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 نيرة، ولم يتغير لونها فإن النشاء قد تحلل ، أما إذا ظهر لون مخالف فارجع للملاحظات السابقة .

تحذير مهم :

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

- من الجراثيم المحللة للنشاء جرثوم *Bacillus subtilis* .

- من الجراثيم غير المحللة للنشاء جرثوم *E. coli* .

هـ - اختبار ONPG :

إن بعض الأحياء الدقيقة مثل *E. coli* تستطيع استخدام سكر اللاكتوز كمصدر وحيد للكربون ، وهناك إنزيم أساسية في عملية استقلاب هذا السكر هي β -galactosidase تقوم هذه الإنزيم بحلمة اللاكتوز إلي غلوكوز وغالاكتوز .

وبدلاً من استعمال اللاكتوز وهو الركيزة الطبيعية لهذه الإنزيم، نقوم باستعمال ركيزة صناعية وهي:

O-nitro-phenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)، حيث إنه وبوجود

الماء تحطم β -galactosidase جزيئة ONPG إلى غالاكتوز و O-nitrophenol

إن ONPG عديمة اللون ولكن نتيجة التفكك نحصل على O-nitrophenol

الذي يكون أصفرَ في الوسط القلوي. فعند إضافة قرص من ONPG

وحضنه مع الجرثوم المدروس، وتحول لون الوسط إلى الأصفر، يعني هذا

أن الاختبار ايجابي بالنسبة لنشاط β -galactosidase. (الشكل 69).

المواد والأدوات اللازمة:

- 1 - أنبوب اختبار معقم . دون عليه اسمك واسم الجرثوم المراد اختباره .
 - 2 - NaCl بتركيز 0.85% (ماء فيزيولوجي) معقم .
 - 3 - أقراص ONPG المصنعة مسبقاً .
 - 4 - إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
 - 5 - مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- طريقة العمل :** (عند استعمال أقراص ONPG)
- 1 - ضع 0.2 مل من NaCl 0.85% المعقم في أنبوب معقم ، ثم لقم بالجرثوم المدروس (ملء عقدة من المستعمرة) .
 - 2 - ضع قرصاً من ONPG ، واحضن على حرارة 37°م .
 - 3 - تفحص الأنبوب بعد 20 دقيقة وبعد 4 ساعات .



الشكل 78
اختبار ONPG

4 - في حال أصبح لون الأنبوب أصفرَ فإن تفاعل β -galactosidase

إيجابي . أما عدم ظهور تغير في اللون فالاختبار سلبي .

- من الجراثيم ايجابية ONPG جرثوم *E. coli* .

- من الجراثيم سالبة ONPG جرثوم *Salmonella* .

ثانياً : اختبارات التحلل البروتيني :

تستطيع كثير من الجراثيم أن تفكك البروتينات، وتستخدم الببتيدات والحموض الأمينية الناتجة عن ذلك لتحقيق نموها ، كما يمكن أن تستخدم الحموض الأمينية لأغراض أخرى كالحصول على الطاقة ، وينتج عن ذلك عادة مجموعة من النواتج النهائية (ماء - نشادر - اندول الخ) كما يمكن أن تستخدم لإنتاج حموض أمينية بنائية أخرى .

وتعد طريقة استخدام الأحياء الدقيقة للحموض الأمينية والبروتينات مميزة للأجناس والأنواع وهي تستخدم لتحديد لها وتمييزها .

أ - إمالة الجيلاتين :

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن الجراثيم المحللة للبروتينات ، ونحصل على الجيلاتين اعتباراً من البروتينات الحيوانية حيث يغزر وجوده في النسيج الواصلة ، ويكون الجيلاتين مائعاً (مصهوراً) عند درجة الحرارة 25°م وما فوق، وصلباً عند درجات الحرارة الأقل من ذلك .

إن الجراثيم المنتجة للجيلاتيناز Gelatinase أو Protease تستطيع أن تميع الهلام حتى في درجات الحرارة المنخفضة، بينما لا تستطيع الأنواع الجرثومية الأخرى تحليله فيبقى صلباً في درجات الحرارة الأدنى من 25°م، وبذلك يمكن تحديد الأنواع الجرثومية وتصنيفها .

المواد والأدوات اللازمة :

1- أنابيب اختبار أو أطباق بتري حاوية على وسط الجيلاتين المعقم

(راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية).

2- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .

3- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة أو مستقيمة .

طريقة العمل :

1- اكتب على الأطباق والأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .

2- لقح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة التخطيط . اترك طبق شاهد بدون تلقيح .

3- لقح الأنابيب السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة الوخز . اترك أنبوب شاهد بدون تلقيح.

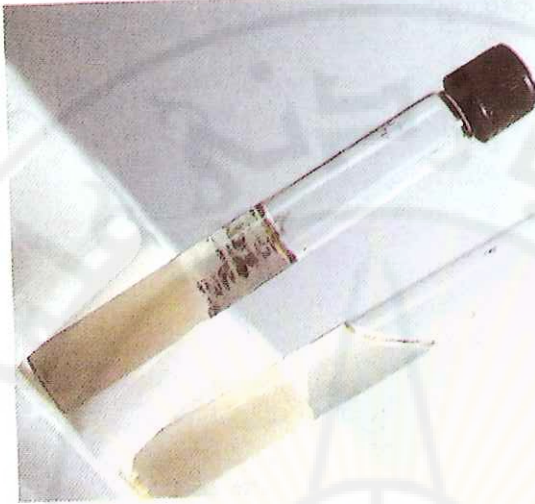
4- ضع الأطباق والأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 1 إلى 7 أيام .

5- بعد مدة الحضان المناسبة اكشف عن إمالة الجيلاتين، وذلك بوضع الأنابيب في الثلاجة مدة نصف ساعة أو بوضعها في إناء مملوء بقطع من الثلج ، فإذا تجمد الجيلاتين كانت النتيجة سلبية ، أما إذا بقي سائلاً فإن الجراثيم تحوي على الإنزيم المحلل للجيلاتين . (شكل 79)

ملاحظة : إذا أردت أن تدرس شكل النمو والإسالة، فاحضن الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة أو بالحاضنة على درجة الحرارة 24°م لمدة أسبوعين .

6- للكشف عن إمالة الجيلاتين في الأطباق ، اغمر سطح الجيلاتين في هذه الأطباق بعد فترة الحضان بمحلول كبريتات الأمونيوم 3-5%، واتركه نحو خمس دقائق ثم تخلص من المحلول. إن ظهور منطقة شفافة حول

المستعمرات الجرثومية يعد دليلاً على تحلل الجيلاتين ، بينما يدل وجود الراسب الأبيض حول المستعمرات على عدم تحلله .



الشكل 79

اختبار إمالة الجيلاتين : الأنبوب بالأسفل موجب إمالة الجيلاتين ، أما الأنبوب بالأعلى فسالبة الإمالة

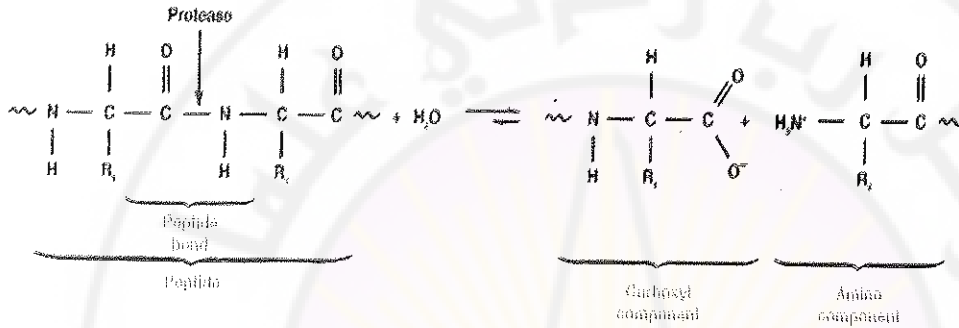
7- دوّن النتائج في جدول على النحو التالي :

جدول رقم 7

نوع الجرثوم	الجيلاتين في الأنابيب		الجيلاتين في الأطباق
	شكل النمو	شكل الإسالة	
<i>E . Coli</i>			
<i>B . subtilis</i>			
<i>St . faecalis</i>			

ب - إمالة الكازئين :

يعدُّ الكازئين المادة البروتينية الأساسية في الحليب ، يوجد بشكل معلق غروي يعطي الحليب لونه المعروف ، تقوم كثير من الجراثيم بإمالة الكازئين لتنتج مشتقات أكثر قابلية للانحلال، وفق التفاعل الآتي :



والكازئين هو فوسفو بروتين تفككه الجراثيم التي تصنع إنزيماً خارجياً هو Caseas ، وتستخدم هذه الخاصة في تحضير الأجبان، كما يمكن الاستفادة منها في تمييز الجراثيم وتصنيفها .

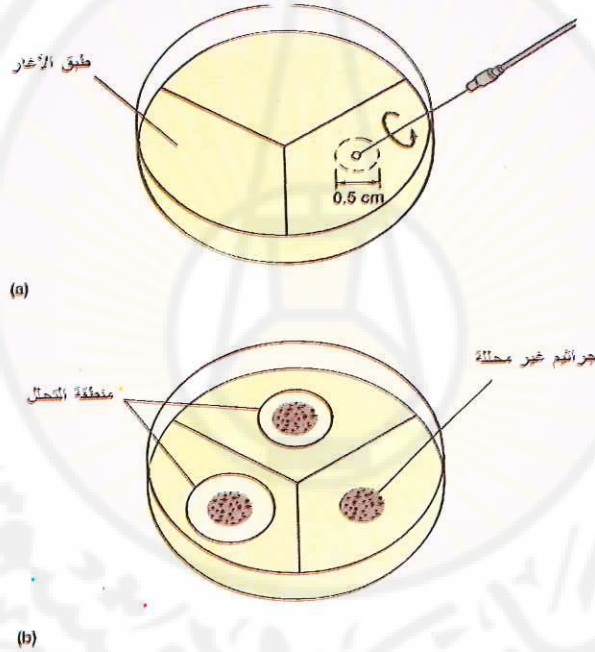
المواد والأدوات اللازمة :

- 1- أطباق بتري فارغة ومعقمة .
- 2- وسط الآغار المغذي المعقم (راجع صفحة تحضير الأوساط الزرعية) والموجود في أرلينة .
- 3- حليب طازج منزوع القشدة معقم ، أو حليب مجفف معقم منزوع الدسم .
- 4- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .

5- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- اصهر الآغار المغذي، وبرده إلى درجة الحرارة 45°م - 50°م، ثم أضف له الحليب المعقم، وبشروط عقيمة بنسبة 1 مل حليب لكل 10 مل آغار مغذي ، أو بنسبة لا تزيد على 5% من الحليب الجاف .
- 3- لقح الأطباق السابقة بالجراثيم الموجودة أمامك بطريقة التخطيط أو بشكل بقع ويفضل وخز الطبق . (الشكل 80).



الشكل 80

شكل يوضح وجود هالات شفافة حول الجراثيم المحللة للكالزئين

- (a) لقح الطبق بالجراثيم المراد اختبارها
- (b) ظهور هالات شفافة تعني حلمهة الكالزئين

4- ضع الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 3 - 7 أيام

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

ج - اختبار إنتاج الاندول :

الاندول مركب آزوتي نحصل عليه نتيجة تفكك الحمض الأميني التربيتوفان بالجراثيم، وتكمن أهمية هذا الاختبار في أن عدداً قليلاً فقط من الجراثيم يمكنها أن تقوم بذلك، وليس من الضروري استخدام التربتوفان النقي في وسط الاختبار، ولذلك يستخدم عادة التربيتون الناتج عن هضم بعض البروتينات والحاوي على نسبة مرتفعة من التربتوفان.

ويمكن إجراء الاختبار بزرع الجرثوم على وسط الماء الهضموني العادي أو الغني بالتربيتوفان، فإذا كان الجرثوم حاوياً على Tryptophanase سيتم تحطيم التربيتوفان وإنتاج الاندول، وبعد زرع الجرثوم نستطيع الكشف عن الاندول بكاشف يسمى إيرلخ - كوفاكس Ehrlich - Kovacs وهو بارا دي ميتيل أمينوبنزالدهيد Paradimethylaminobenzaldehyde .

حيث نضع بضع قطرات من الكاشف على الأنبوب المزروع بالجرثوم فنلاحظ حصول حلقة حمراء شديدة نوعية دالة على تحرر الاندول على سطح الأنبوب (الشكل 81) .

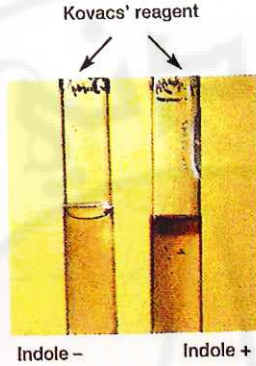
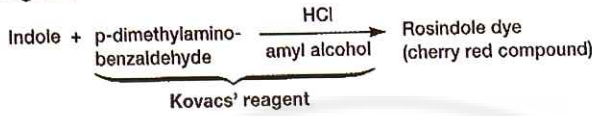
ملاحظة :

إن إضافة أحد السكريات القابلة للتخمر من قبل الجرثوم يمكن أن يعيق هذا الاختبار؛ لأن سرعة تشكل الحمض اعتباراً من السكريات سيؤدي إلى تثبيط الإنزيمات المحللة للبروتينات .

انتفاصل بوجود الجراثيم



انتفاصل داخل الأنباب



الشكل 81

اختبار إنتاج الاندول

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24-48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أنابيب اختبار حاوية على وسط الماء الهضموني المعقم (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .
- 4- كاشف إيرلخ - كوفاكس Ehrlich - Kovacs .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنباب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لّح الأنباب الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها .
- 3- ضع الأنباب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24-48 ساعة.

4- بعد فترة الحضانة، أخرج الأنابيب من الحاضنة، وضع فوق كل أنبوب قطرة من كاشف إيرلخ - كوفاكس .

5- دوّن النتائج .

- من الجراثيم إيجابية إنتاج الاندول جرثوم *E. coli* .

- من الجراثيم سالبة إنتاج الاندول جرثوم *Klebsiella - Salmonella* .

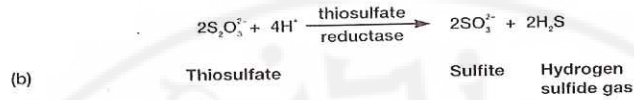
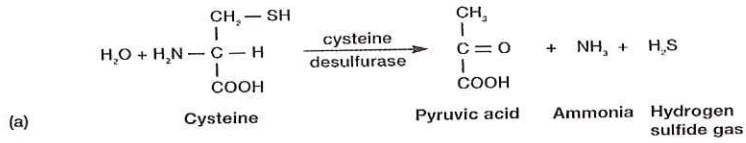
د - اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين H_2S :

تقوم بعض الجراثيم بتخريب الحموض الأمينية الكبريتية مثل السيستئين لتحرير غاز H_2S كما في التفاعل الموضح في 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 ليشكل لوناً أسوداً مميزاً .

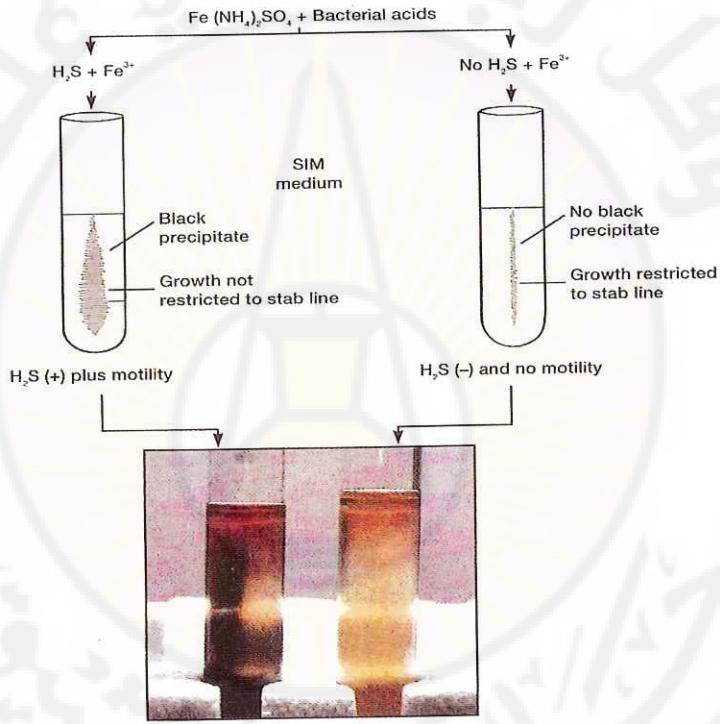
ويمكن إيضاح هذه الظاهرة في المزارع الجرثومية المخبرية باستخدام أوساط تحتوي على أملاح معدنية لبعض العناصر مثل البزموت أو الحديد أو الرصاص حيث يتشكل كبريت المعدن ذو اللون المميز، مثال : تحت خلاص الرصاص يتحول إلى كبريت الرصاص الأسود بعد تفاعله مع غاز H_2S ، وكبريتات الحديد تتحول إلى كبريت الحديد الأسود اللون بعد تفاعلها مع H_2S . (الشكل 82) .

لتحقيق الاختبار هناك عدة أوساط تقي بالغرض يمكن استخدامها ومنها وسط S . S (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .

التفاعل بوجود الجراثيم



التفاعل داخل الأنبوب



الشكل 82

اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين

الأنبوب على اليمين سالب (عدم تشكل H_2S) - الأنبوب على اليسار موجب (تشكل اللون الأسود يعني تشكل H_2S).

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أطباق بتري حاوية على وسط S . S المعقم

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
 - 2- لقح الأطباق الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط .
 - 3- ضع الأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 - 48 ساعة .
 - 4- بعد مدة الحضان ، أخرج الأطباق من الحاضنة، واقرأ النتيجة بظهور اللون الأسود .
 - 5- دوّن النتائج .
- من الجراثيم إيجابية إنتاج غاز H_2S جرثوم *Proteus* - *Salmonella* .
- من الجراثيم سالبة إنتاج غاز H_2S جرثوم *E. coli* .
- هـ - نزع الأمين من الحموض الأمينية (الفينيل ألانين) :
- يمكن لبعض الجراثيم أن تقوم بنزع زمرة الأمين من الحموض الأمينية المتوفرة في أوساطها لإنتاج حموض عضوية وماء وأمونيا كما هو واضح في التفاعل الوارد في (الشكل 83) .
- ومن ثمّ يمكن بسهولة الكشف عن عملية نزع الأمين بكشف إنتاج النشادر الذي يبقى منحلّاً ضمن الوسط ، أو بطرق أخرى .

ونفتش بصورة خاصة عن الخميرة النازعة للأمين لحمض الفينيل ألانين للتفريق بين الجراثيم المعوية مثل *E. coli* سالبة نزع الأمين و *Proteus* إيجابية نزع الأمين. بالإضافة إلى أن نزع الأمين ينزع سمية بعض الأمينات التنبؤية .

إن الجراثيم القادرة على إنتاج Phenylalanine deaminase تستطيع أن تنزع أمين الفينيل ألانين منتجة حمض بيروفيك الفينيل Phenyl pyruvic acid وعند إضافة $FeCl_3$ للوسط فإنه سيتفاعل مع حمض البيروفيك فينيل ليعطي مركباً ذا لون أخضر مصفر. أما الجراثيم غير القادرة على إنتاج هذه الإنزيم فلا تعمل على إظهار اللون الأخضر المصفر عند إضافة $FeCl_3$ (الشكل 83).

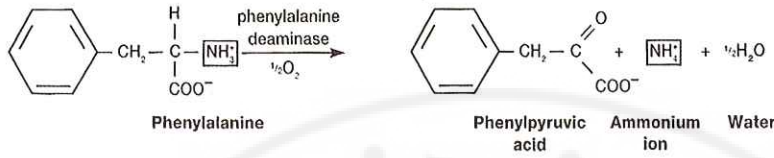
المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أنابيب حاوية على وسط Phenylalanine deaminase Agar .
- 4- محلول $FeCl_3$ بتركيز 10% .

طريقة العمل :

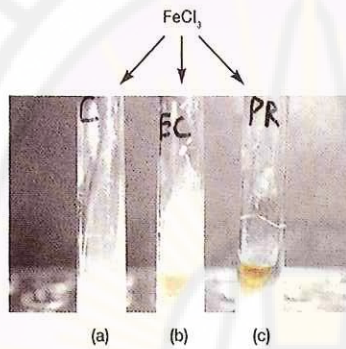
- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقح الأنابيب السابقة بالجراثيم المراد اختبارها ، واترك أنبوباً شاهداً بدون تلقيح .

التفاعل بوجود الجراثيم



التفاعل داخل الأنابيب

Phenylpyruvic acid + ferric chloride (FeCl₃) → green complex

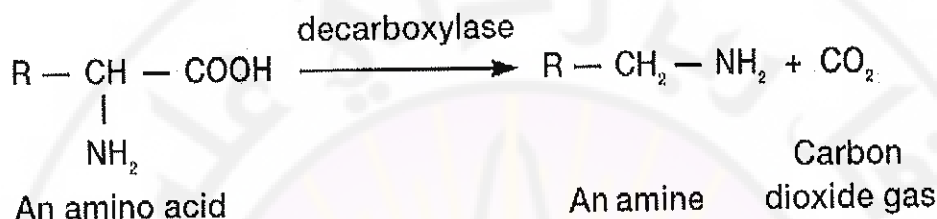


الشكل 83

اختبار نزع الأمين من الفينيل ألانين
(a) شاهد - (b) سلبي - (c) ايجابي

- 3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 18 - 24 ساعة.
- 4- بعد مدة الحضان، أخرج الأنابيب من الحاضنة، وأضف من 1 - 2 قطرة من FeCl₃ بتركيز 10% إلى الوسط. إن ظهور لون أخضر مصفر بعد 1 - 5 دقائق دليل إيجابية التفاعل .
- 5- دون النتائج .

و - نزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية (الليزين والأورنيتين) :
تقوم بعض الجراثيم بإنتاج إنزيمات تؤثر في الحموض الأمينية ، فتتزع مجموعة الكربوكسيل وينتج عن ذلك الأمين وغاز ثاني أوكسيد الكربون كما هو موضح بالمعادلة التالية:



إن الجراثيم القادرة على إنتاج الليزين ديكاربوكسيلاز Lysine decarboxylase و Ornithine decarboxydase تستطيع نزع كربوكسيل الليزين والأورنيتين واستخدام الأمينات الناتجة كمواد أصل من أجل تركيب جزيئات جديدة ضرورية للخلية .

إن الجراثيم النامية في الأوساط السائلة تقوم بنزع كربوكسيل الحموض الأمينية بصورة فعالة عندما تكون الظروف لاهوائية وحمضية ضعيفة، لذلك وجود سكر قابل للتخمر من قبل الجرثوم، ينتج فضلات حمضية في الوسط فيتم بذلك تنشيط إنزيمات نزع الكربوكسيل التي ينتج عنها أمينات قلوية تقوم برفع pH الوسط مما يجعله أكثر ملائمة للنمو .

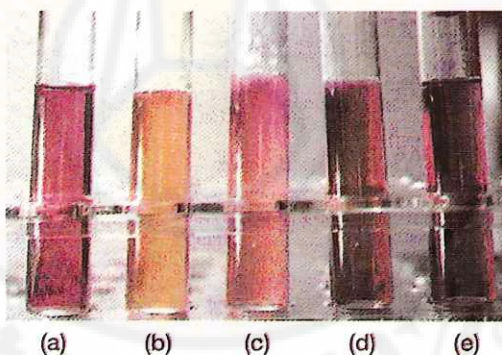
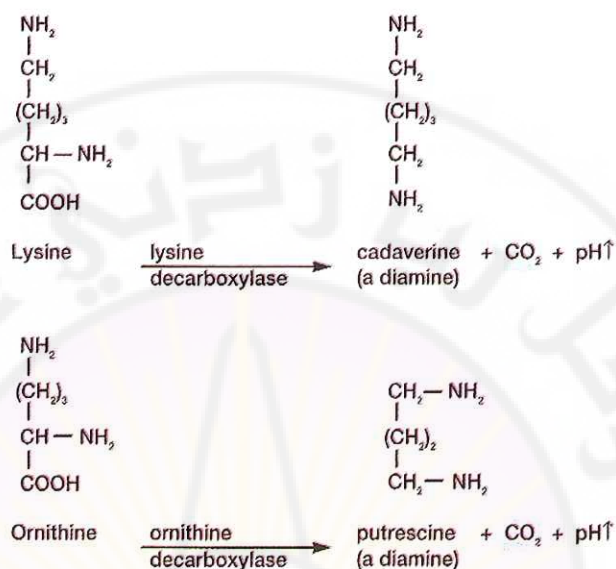
ويستخدم عادة وسط موللر Muller الذي يحوي الماء الهضموني الحاوي على الغلوكوز ويضاف إليه أحد الحموض الأمينية المراد اختبارها مثل

الليزين، الأورنيتين، مع مشعر بنفسجي البروم كريزول Bromcresol purple . وقبل الحضان يجب تغطية سطح الوسط السائل بطبقة من الزيت المعدني المعقم لمنع الأوكسجين من الوصول إلى الجراثيم وإيقاف التفاعل .
ملاحظة:

إن الحموض الناتجة عن تخمر الغلوكوز من قبل الجراثيم سوف تخفض pH الوسط، وتغير لون المشعر من البنفسجي إلى الأصفر فتتنشط إنزيمات نزع الكربوكسيل فيقوم الجرثوم بإنتاج الأمين الذي يعادل الوسط ويقلب لون المشعر من الأصفر إلى البنفسجي مرة أخرى (الشكل 84).
هناك العديد من الأوساط التي تستخدم لهذا الغرض أهمها :

- وسط (LDC) Moller's Lysine decarboxylase broth with Lysine .
- وسط (ODC) Moller's Ornithine decarboxylase broth with Ornithine .
- وسط (DC) Moller's Lysine decarboxylase broth without Lysine الذي يستخدم كشاهد .
- وسط (DC) Moller's Ornithine decarboxylase broth without Ornithine الذي يستخدم كشاهد.
- وأيضاً وسط (LIA) Lysine iron Agar الذي يستعمل للتفريق بين أجناس Enterobacteriaceae اعتماداً على قابليتهم لنزع كربوكسيل الليزين وإنتاج H_2S ، حيث إن الجراثيم التي تنزع كربوكسيل الليزين تحول الوسط إلى اللون البنفسجي والمنتجة لكبريت الهيدروجين H_2S تظهر كمستعمرات سوداء .

انتفاخ بوجود الجراثيم



الشكل 84

اختبار نزع الكربوكسيل من الليزين

(a) شاهد - (b) ايجابي ضعيف - (c) ايجابي - (d) ايجابي شديد

إن نزع كربوكسيل الليزين هام للتفريق بين *Pseudomonas* (L-) و *Klebsiella* (L+) و *Enterobacter* (L+) و *Citrobacter* (L-) . أما نزع كربوكسيل الأورنيتين فهو هام للتمييز بين *Klebsiella* (O-) و (O-) *Proteus* و *Enterobacter* (O+) .

*هناك حالياً اختبارات سريعة على شكل أقراص مصنعة تجارياً .

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أنابيب حاوية على الأوساط التالية : وسط LDC , ODC , DC , OD . LIA
- 4- زيت معدني معقم .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقم أربعة أنابيب من وسط LDC أو أربعة أنابيب من وسط LIA بالجرثوم المراد اختباره ولقم أنبوباً واحداً من وسط DC كشاهد .
- 3- كرر نفس الخطوة السابقة مع وسط ODC ووسط OD شاهداً .
- 4- ضع طبقة من الزيت المعدني المعقم (حوالي 1 مل من الزيت) على الأنابيب الحاوية على الأوساط السائلة والملقحة بالجرثوم (وسط LIA لا يحتاج للزيت لأنه صلب) .
- 5- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 - 48 ساعة.

6- بعد مدة الحضان، أخرج الأطباق والأنابيب من الحاضنة واقرأ النتيجة بانقلاب اللون وبالمقارنة مع الشاهد وفق ما يلي (اللون البنفسجي دليل القلوية) :

- أنبوب أصفر يعني أن التفاعل سلبي .
 - أنبوب بنفسجي فاتح يعني أن التفاعل إيجابي ضعيف .
 - أنبوب بنفسجي غامق يعني أن التفاعل إيجابي .
- 7- دوّن النتائج .

ز - الكشف عن الجراثيم المحللة للدم :

يعدّ وسط الدم الآغاري (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) وسطاً مميزاً لبعض الأنواع الجرثومية الممرضة ، ونظراً لإمكانية اختلاف تأثيرات هذه الجراثيم باختلاف مصدر الدم يستخدم عادة دم الحصان أو الخروف منزوع الليفين للزراعة، وينبغي أن يحتوي الوسط على نسبة 0.5% من ملح الطعام لمنع التحلل العفوي لكريات الدم الحمراء .

يساعد هذا الاختبار كثيراً في تشخيص المكورات العقدية، حيث إن طريقة انحلال الدم تختلف حسب نوع العقديات ، وذلك وفق ما يلي :

1- انحلال كامل للدم نموذج بيتا β Hemolyse : يلاحظ هذا الانحلال بشكل هالة نيرة حول مستعمرة الجرثوم قطرها نحو 3-4 مم ناتجة عن انحلال كامل للكريات الحمراء ، ومثالها المكورات العقدية المقيحة *Streptococcus pyogenes* (الزمرة A) (الشكل 85) .

2- انحلال جزئي للدم نموذج ألفا α Hemolyse : هذا الانحلال يكون بشكل هالة نصف شفافة حول مستعمرة الجرثوم بقطر 1-2 مم ناتجة عن انحلال جزئي غير كامل للكريات الحمراء وهذه الهالة أحياناً

تكون مترافقة بلون أخضر، ومثالها المكورات العقدية المخضرة
Streptococcus viridans، والمكورات العقدية الرئوية.

3- عدم حدوث انحلال للدم حول المستعمرة، ومثالها المكورات العقدية
البرازية *Streptococcus faecalis* (*Eaterococcus*).

- المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أطباق بتري حاوية على وسط الدم الأغاري المعقم .



الشكل 85

شكل يظهر أنماط انحلال الدم بفعل الجراثيم

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقح الأطباق الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة
التخطيط .

3- ضع الأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة . ويفضل الحضان مع وجود نسبة من غاز ثاني أوكسيد الكربون لتنشيط نمو الجرثوم .

4- بعد فترة الحضان، أخرج الأطباق من الحاضنة واقرأ النتيجة بظهور حالات الانحلال وشكلها أو عدم وجودها .

5- دون النتائج .

ح - اختبار المخثران Coagulase للكشف عن المكورات العنقودية الممرضة *Staphylococcus aureus*:

المخثران إنزيم خارجي قادر على أن يخثر المصورة الدموية للإنسان والأرنب ، وتفرزه المكورات العنقودية بالخاصة . وهذا المخثران يؤدي إلى حصول خثرات داخل الأوردة تكون السبب الرئيسي في إنتان الدم، كما تكون المكورات العنقودية المنتجة لـ Coagulase خثرة ليفية حولها لتمنع أي هجوم محتمل من قبل دفاعات الجسم. وبعد اختبار المخثران أكثر الاختبارات كفاءة في تحديد المكورات العنقودية الممرضة وتمييزها، ويستخدم عادة لهذا الغرض دم الأرنب أو الإنسان بعد أن تضاف إليه مادة الأوكسالات أو السيترات لمنع تخثر الدم ومنع النتائج الإيجابية الكاذبة، ثم يثقل لعزل الكريات الدموية منه ، بينما تستخدم البلاسما الناتجة لإجراء الاختبار، وفي الأسواق حالياً بلاسما مجففة معبأة في زجاجات صغيرة يمكن استخدامها مباشرة بعد حلها بالماء المعقم .

المواد والأدوات اللازمة :

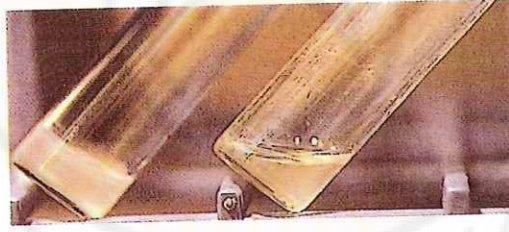
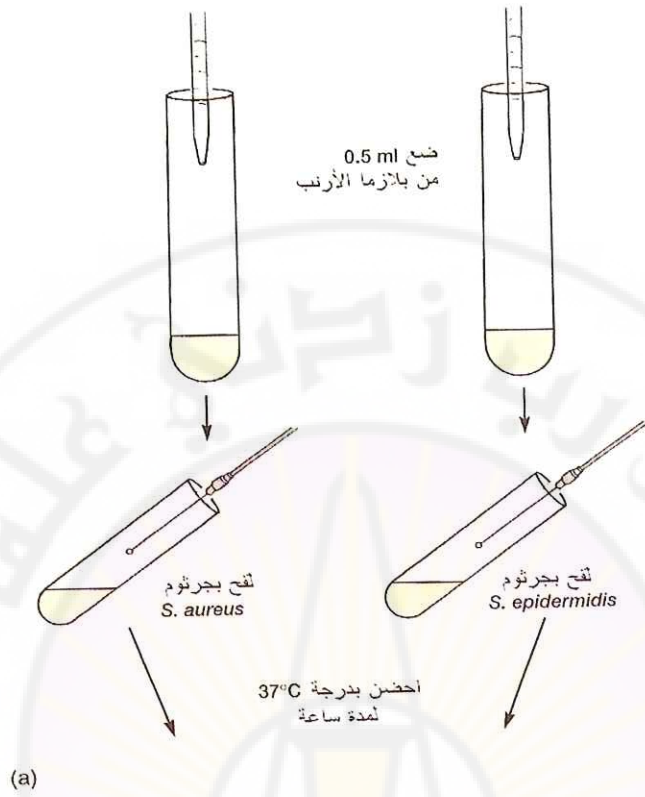
1- مزارع جرثومية نقية لأنواع مختلفة من المكورات العنقودية بعمر 24 - 48 ساعة مزروعة على المرق المغذي .

2- أنابيب اختبار معقمة بداخلها 0.5 مل من مصورة دم الخروف أو الإنسان العقيمة تماماً والمضاف إليها مادة الأوكسالات أو السيترات.

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- ضع 0.5 مل من مزروع الجرثوم فوق مصورة الدم ، وامزجها قليلاً .
- 3- احضن الأنابيب بدرجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة . إن دراسة النتائج يجب أن تتم بمراقبة الأنبوب أثناء فترة الحضانة بالحاضنة وكل ساعة على الأقل ، ويمكن أن نقول بأن المكورات العنقودية الممرضة تخثر المصورة بمدة تتراوح بين نصف ساعة و 24 ساعة، وبالتالي تصبح المصورة المخثرة عبارة عن كتلة هلامية متصلبة بعد أن كانت سائلة (الشكل 86) .
- 4- دوّن النتائج .

- من العنقوديات موجبة المختراز *Staphylococcus aureus* .
- من العنقوديات سالبة المختراز *Staphylococcus epidermidis* .



(b)

الشكل 86

اختبار المخثرات

(a) تمثل مراحل إجراء الاختبار - (b) تمثل نتيجة الاختبار : الأنبوب إلى اليمين ملقح بجرثوم *Staphylococcus epidermidis* سالب المخثرات ، أما الأنبوب إلى اليسار فملقح بجرثوم *Staphylococcus aureus* موجب المخثرات. ثالثاً - اختبارات أخرى :

أ - دراسة إمكانية النمو على وسط لا يحتوي إلا على فحم معدني (وسط سيمون Simmon) :

وسط سيمون (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) وسط صناعي يكون فيه المصدر الوحيد للكربون هو سترات الصوديوم ، وإن الجراثيم التي تستطيع أن تفكك السترات هي وحدها فقط يمكنها استخدام الفحم من الوسط لإنتاجها السيتراز Citrase ومن ثمّ يمكنها أن تنمو على هذا الوسط وتقلونه (تجعله قلويًا). وفق التفاعل الوارد في (الشكل 87) .

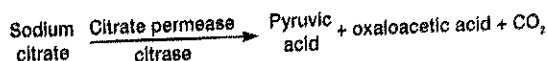
إن الوسط حاو على مشعر أزرق البروموتيمول الذي يكون أخضر مزرق بالوسط المعتدل، ويصبح أزرق اللون بالوسط القلوي وأصفر بالوسط الحامضي .

إن نمو الجرثوم في هذا الوسط يؤدي إلى ارتفاع قيمة pH مما يؤدي إلى تغير لون المشعر الموجود في الوسط إلى اللون الأزرق ، ومن ثمّ يكون الجرثوم في هذه الحالة قادراً على استخدام السترات مصدراً للكربون والطاقة (الشكل 87)

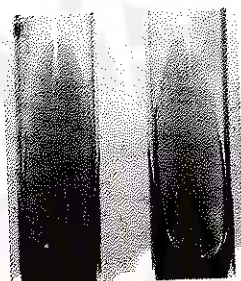
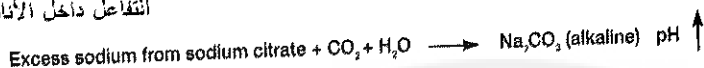
ملاحظة: أحياناً ينمو الجرثوم على وسط سيمون دون أن يقلب اللون، عندها يكون الاختبار ايجابياً .

ملاحظة: نزرع عادة هذا الوسط اعتباراً من مزروع الجراثيم المعزول على أوساط صلبة ، وليس من مزرعة سائلة مثل المرق المغذي أو الماء الهضموني وذلك لاحتوائها على مصادر عضوية للكربون من شأنها أن تغير النتائج .

التفاعل بوجود الجراثيم



التفاعل داخل الأنباب



(a) Citrate +
(b) Citrate -

الشكل 87

اختبار إمكانية النمو على وسط سيمون

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أطباق بتري أو أنابيب بالوضع المائل حاوية على وسط سيمون المعقم .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأطباق (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقح الأطباق والأنابيب الموجودة أمامك بالجراثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط .

3- ضع الأنابيب والأطباق بالوضع المقلوب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 - 48 ساعة .

4- بعد فترة الحضانة، أخرج الأطباق والأنابيب من الحاضنة واقرأ النتيجة بظهور النمو وانقلاب اللون .

5- دون النتائج .

- من الجراثيم التي تستطيع النمو على وسط سيمون جرثوم

Klebsiella .

- من الجراثيم التي لا تستطيع النمو على وسط سيمون جرثوم *E.coli* .

ب - إمالة البولة (الكشف عن اليورياز Urease) :

تستطيع بعض الجراثيم أن تحلل البولة إلى نشادر وذلك بسبب قدرتها على إنتاج كميات كبيرة من اليورياز Urease التي تهاجم رابطة الكربون - آزوت في مركبات الأميد لتعطي نواتج نهائية مثل الأمونيا و CO_2 والماء، كما في التفاعل الوارد في (الشكل 88) .

حيث تتفكك البولة إلى نشادر، والنشادر يتحول بدوره إلى فحمات المونيوم الذي يقلون الوسط (يجعله قلويًا) مما يؤدي إلى ارتفاع رقم pH إلى أكثر من 8.1 خلال 48 ساعة، وبهذا يمكن قياس نشاط هذه الإنزيمات باستخدام وسط يحوي البولة مع محلول منظم Buffer ومشعر هو أحمر الفينول، أرجواني اللون في الوسط المعتدل واصفر في الوسط الحامضي وأحمر بنفسجي في الوسط القلوي . (الشكل 88)
المواد والأدوات اللازمة :

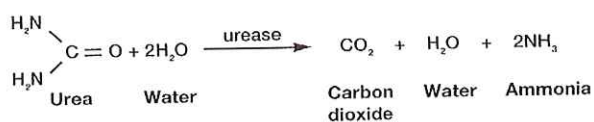
1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .

2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .

3- أنابيب بالوضع العميق حاوية على وسط البولة (راجع دليل

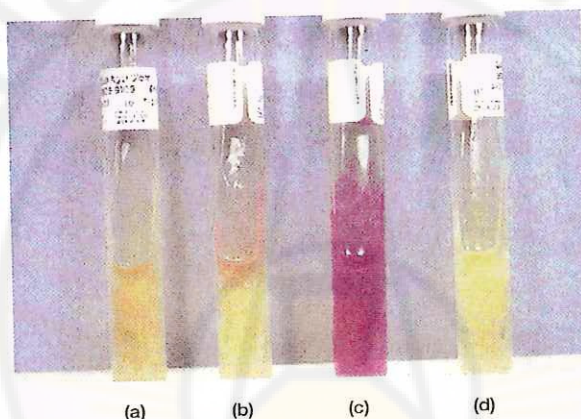
تحضير الأوساط الزراعية) المعقم .

التفاعل بوجود الجراثيم



التفاعل داخل الأنابيب

Ammonia + phenol red $\longrightarrow$ deep pink



الشكل 88

اختبار إمالة البولة

(a) - أنبوب شاهد. (b) - أنبوب إيجابي متأخر

(c) - أنبوب إيجابي سريع. (d) - أنبوب سلبي

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقم الأطباق والأنابيب الموجودة أمامك بالجرثيم المراد اختبارها بطريقة التخطيط .

3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 - 48 ساعة أو أسبوع .

4- بعد مدة الحضان، أخرج الأنابيب من الحاضنة وقرأ النتيجة بانقلاب اللون إلى اللون الأحمر البنفسجي.

5- دوّن النتائج .

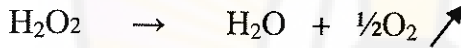
- من الجراثيم إيجابية اليورياز

Proteus vulgaris , *Klebsiella pneumoniae* .

- من الجراثيم سالبة اليورياز *E. coli* , *Salmonella* .

ج - اختبار نشاط الكاتالاز :Catalase

تحتوي بعض الجراثيم على الكاتالاز وهي ضرورية لنمو الجراثيم الهوائية، حيث تفكك هذه الماء الأوكسجيني إلى ماء و أوكسجين غازي وفق التفاعل الآتي :



ويمكن ملاحظة انطلاق الأوكسجين عند إضافة بضع قطرات من الماء الأوكسجيني بتركيز 3 -4% إلى المزارع الجرثومية . وهذا الاختبار مهم للتمييز بين الجراثيم ايجابية غرام العنقودية (إيجابية الكاتالاز) والعقدية (سلبية الكاتالاز) .

المواد والأدوات اللازمة :

1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 -48 ساعة .

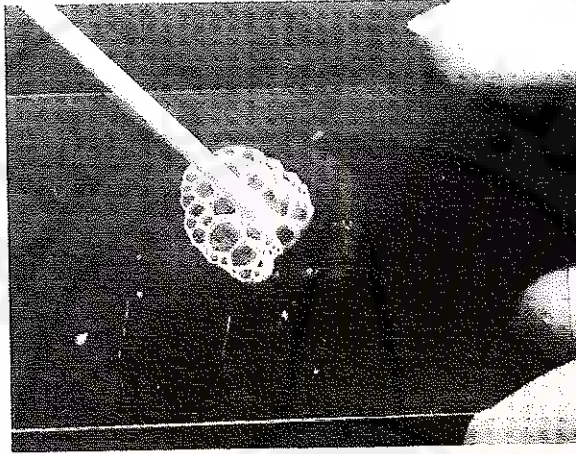
2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .

3- صفائح زجاجية نظيفة .

4- ماء أوكسجيني بتركيز 3 -4% .

طريقة العمل :

- 1- ضع جزءاً من المستعمرة الجرثومية بإبرة الزرع الجرثومية على صفيحة نظيفة، وضع فوقها قطرة من الماء الأوكسجيني. لاحظ انطلاق فقاعات الأوكسجين مباشرة في حال ايجابية التفاعل. (الشكل 89)



الشكل 89

اختبار الكاتالاز : تشكل فقاعات الأوكسجين دليل الايجابية

أو ضع قطرة الماء الأوكسجيني مباشرة على طبق بتري حاوياً على الجرثوم المراد اختباره، شريطة أن لا يكون الجرثوم مزروعاً على وسط حاو على الدم لأن الدم يحوي الكاتالاز، وعندها يكون الاختبار إيجابياً حتماً، ولكن بعد 10 ثوان .

2- دوّن النتائج .

د - اختبار نشاط السيتوكروم أوكسيداز Cytochrom - Oxidase :

يمكن استخدام هذا الاختبار لتمييز بعض الجراثيم مثال العصيات الزرقاء *pseudomonas aeruginosa* والنايسريات *Neisseria* (إيجابية الأوكسيداز) وذلك اعتماداً على قياس نشاط السيتوكروم C . حيث يزرع الجرثوم على مستنبت صلب وبعد حضانة 24 ساعة بدرجة 37°م يرذ على سطح المستعمرات قطرتان من كل من المحولين التاليين :

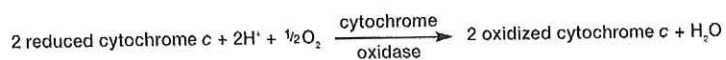
- 1- محلول 1% من الفا نفتول في الغول الايتيلي .
 - 2- محلول 1 % من حماضات بارا أمينو دي ميتيل أنيلين .
- ففي حال وجود إنزيم الأوكسيداز سيظهر لون أزرق شديد .
- المواد والأدوات اللازمة :**

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 -48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- ورقة ترشيح .
- 4- المحاليل السابقة .

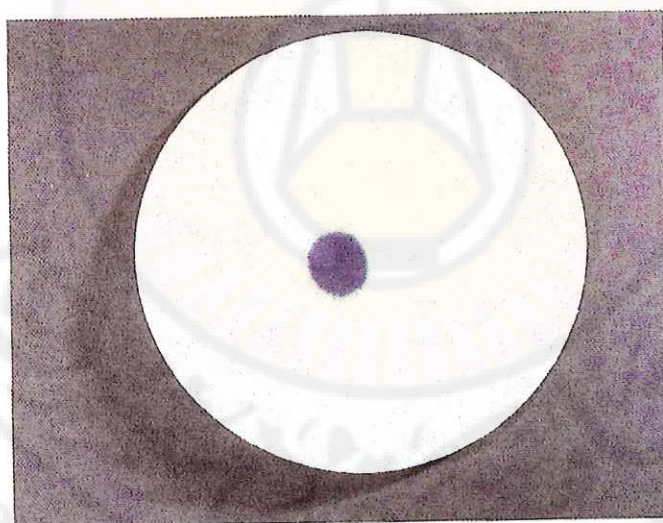
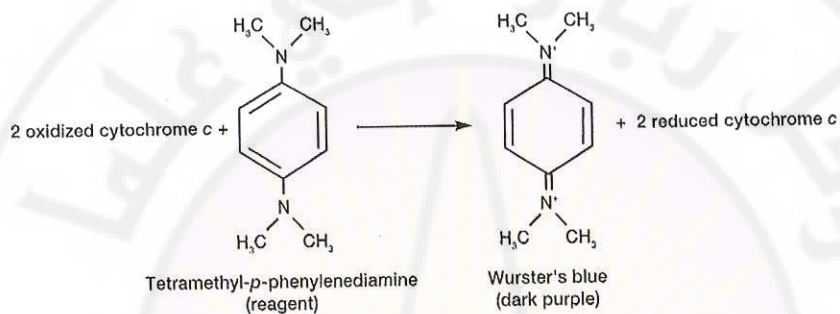
طريقة العمل :

- 1- ضع جزءاً من المستعمرة الجرثومية بإبرة الزرع الجرثومية على ورقة الترشيح .
- 2- ضع فوقها قطرة من كل من المحاليل السابقة. لاحظ ظهور اللون الأزرق الشديد أو البنفسجي خلال الثواني الأولى للمستعمرة الايجابية فقط. (الشكل 90) .
- 3- دوّن النتائج .

انتفاعل بوجود الجرأئيم



انتفاعل على ورقة الترشيح



الشكل 90

ظهور اللون الأزرق البنفسجي دليل وجود الأوكسيداز

هـ - اختبار إرجاع النترات : Nitrate Reduction

هناك جراثيم تستطيع إرجاع النترات NO_3^- إلى نترات NO_2^- حيث تستعمل النترات كمستقبل نهائي للإلكترون في عملية التنفس اللاهوائي وخلال هذه العملية يتم إرجاع النترات إلى نترات بواسطة Nitrate Reduction ، وبعض من هذه الجراثيم تقوم بإرجاع أوسع للنترات حيث ترجعه إما لشاردة أمونيا أو إلى آزوت جزيئي .

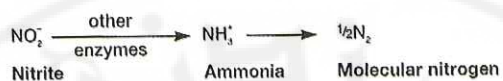
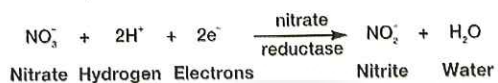
وإن قدرة بعض الجراثيم على إرجاع النترات إلى نترات أو أمونيا أو آزوت جزيئي يمكن استعمالها في عملية عزلها وتشخيصها، فمثلاً: جرثوم الـ *E. coli* يستطيع إرجاع النترات إلى نترات فقط أما جرثوم *P. fluorescens* فهو يرجع النترات بالكامل إلى آزوت جزيئي، بينما جرثوم *Staph. epidermidis* فهو لا يستطيع استعمال النترات كمستقبل نهائي للإلكترون .

يتم إجراء هذا الاختبار بتنمية الجراثيم في أنبوب يحوي على وسط مرق النترات Nitrate broth medium الحاوي 0.5% نترات البوتاسيوم KNO_3 .

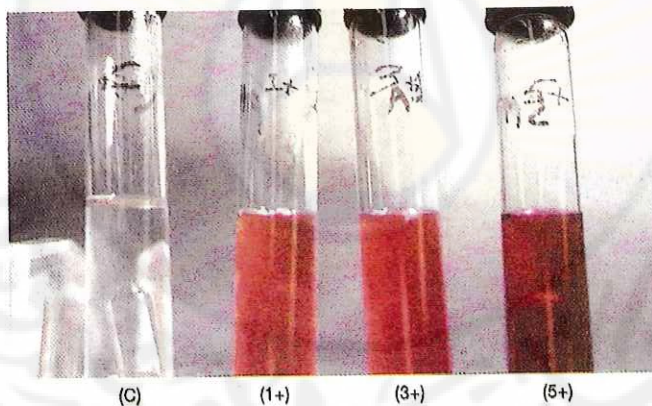
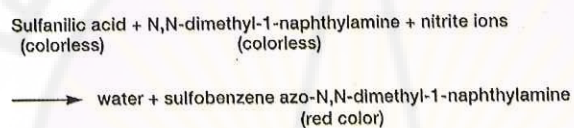
بعد الحضان يتم فحص الوسط لملاحظة وجود غاز و شوارد النترات فيه .

الغاز هو مزيج من CO_2 و N_2 وهو يطلق من عملية إرجاع النترات ومن حلقة حمض الليمون (CO_2) . أما الكشف عن شوارد النترات فيتم بإضافة حمض الكبريت Sulfanilic acid ثم إضافة محلول ن ، ن - دي ميتيل الفا نفتيل أمين N,N - dimethyl - 1- naphthylamine إلى الوسط، وإن أي نترات في الوسط سيتفاعل مع هذه الكواشف المذكورة ليعطي لوناً وردياً أو أحمر . (الشكل 91).

التفاعل بوجود الإنزيم



التفاعل داخل الأنبوب



الشكل 91

اختبار إرجاع النترات

(c) شاهد - (1+) إيجابي ضعيف - (2+) أكثر إيجابية - (5+) إيجابي بشدة.

ملاحظة:

إذا لم يبد الوسط أي تغيير في اللون بعد إضافة الكواشف فهناك عدة احتمالات منها:

- أن الجراثيم تنتج النترات ريدوكتاز Nitrate reductase وترجع النتريت إلى أمونيا أو آزوت جزيئي .
 - أن الجراثيم تنتج أنزيمات أخرى ترجع النتريت إلى أمونيا .
 - أن الجراثيم غير قادرة على إرجاع النترات إلى نتريت .
- ولتحديد أن النترات تم إرجاعها لما بعد النتريت (أمونيا أو آزوت جزيئي) يضاف كمية قليلة من بودرة الزنك إلى الوسط الحاوي على الكواشف السابقة، وبما أن الزنك يرجع النترات إلى نتريت فإن اللون الوردي سيظهر مما يؤكد على أن النترات لم يتم إرجاعه إلى نتريت من قبل الجراثيم، أما في حال عدم ظهور اللون الوردي عند إضافة الزنك فيعتبر دليلاً على أن النترات تم إرجاعه إلى ما بعد مرحلة النتريت أي إلى أمونيا أو إلى آزوت جزيئي .

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- مزارع جرثومية مختلفة بعمر 24 - 48 ساعة .
- 2- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة .
- 3- أنابيب حاوية على وسط Nitrate broth medium الحاوي على 0.5% نترات البوتاسيوم KNO_3 ومنكث بداخلها أنبوب درهام لدراسة انطلاق الغاز .
- 4- حمض الكبريت Sulfanilic acid و محلول ن ، ن - دي ميتيل الفا نفتيل أمين N,N - dimethyl - 1- naphthylamine .

5- مسحوق الزنك .

طريقة العمل :

- 1- اكتب على الأنابيب (اسمك - الفئة - اسم الجرثوم) .
- 2- لقح الأنابيب السابقة بالجراثيم المراد اختبارها ، واترك أنبوب شاهد دون تلقيح للتأكد من عقامة الوسط من جهة ولتحديد فيما لو كان الوسط يطلق غاز O_2 بدلاً من الغاز المطلق من قبل الجرثوم .
- 3- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة $37^{\circ}C$ لمدة 24 - 48 ساعة.
- 4- بعدمدة الحضان، أخرج الأنابيب من الحاضنة، وأضف إليها بضع قطرات من حمض الكبريت Sulfanilic acid ثم إضافة محلول ن، ن- دي ميثيل الفا نفتيل أمين 1- N,N - dimethyl - naphthylamine إلى الوسط وراقب تحول اللون إلى اللون الأحمر عند الأنابيب إيجابية التفاعل .
- 5- أضف للأنابيب سالبة التفاعل بعضاً من حبيبات الزنك ثم حرك جيداً، في حال وجود النتراة في الوسط سيتحول اللون إلى الأحمر خلال 5 - 10 دقائق ، وفي حال غيابه لن يتحول اللون .
- 6- دوّن النتائج .

و - اختبار DNase :

بعض الجراثيم الممرضة وخاصة العنقوديات الممرضة تنتج إنزيماً نووياً Nuclease enzyme يدعى DNase هذا الإنزيم يقوم بتحطيم الحمض النووي DNA للمضيف ويزيد من حدة المرض .

لدراسة وجود DNase نستعمل آغار يحتوي على DNA منحل في الوسط، ثم يتم تلقيح الوسط بالجرثوم المراد اختباره بشكل نقطي، يكون

الاختبار ايجابياً في حال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة المزروعة، هذه المنطقة الشفافة تحدث بسبب تحطم جزيئات DNA الضخمة بالإنزيم، والنواتج النهائية تنحل في الحمض المضاف للوسط . على حين أن DNA السليم لا ينحل في الوسط الحمضي الضعيف بل يترسب فيه، لذلك يكون الوسط حول المستعمرات غير المنتجة للـ DNase قاتماً . كما في (الشكل 92).



الشكل 92
اختبار DNase

المواد والأدوات المستخدمة :

- 1- مزارع جرثومية نقية من أنواع *Staph. aureus* و *Staph. epidermidis* بعمر 24-48 ساعة .

2- طبق بتري يحوي وسط آغار DNase . (راجع دليل تحضير الأوساط الزرعية) .

3- إبر تلقيح جرثومية ذات العقدة.

طريقة العمل :

- 1- قسم طبق حاوي على وسط آغار DNase بقلم كحولي إلى قسمين .
- 2- لفتح سطح الطبق في أحد القسمين بجراثيم *staphylococcus aureus* (موجبة DNase) على شكل نقاط (تلقيح نقطي) بصورة جيدة. ولفتح القسم الآخر بنفس الطريقة بجراثيم *Staphylococcus epidermidis* (سالبة DNase) .
- 3- دوّن على الطبق اسمك واسم كل جرثوم مكان زرعه .
- 4- احضن بدرجة 37°م لمدة 18 - 24 ساعة .
- 5- لقراءة النتيجة أضف على سطح الطبق المزروع بالجرثوم كمية من HCl (1 ن) . إن ظهور هالة شفافة حول المستعمرة هو دليل ايجابية التفاعل .



الفصل الحادي عشر

تعريف الجراثيم المعوية باستخدام نظام $API_{20}E$ Analytical Profile Index

الهدف من التجربة :

التعرف السريع للجراثيم المعوية على مستوى الجنس والنوع
باستخدام نظام $API_{20}E$.
الأساس العلمي :

يحتوي شريط $API_{20}E$ 20 أنبوبة صغيرة تحتوي بيئات جافة تخص
الجراثيم المعوية ، يتم تلقىح هذه البيئات بالمعلق الجرثومي الذي يعمل على
إذابة هذه البيئات .

يتغير لون هذه الأنابيب خلال مدة الحضان، و نتيجة لنمو الجرثوم،
وهذا التغير في اللون إما أن يكون تلقائياً في بعض الاختبارات أو بعد إضافة
الكواشف في اختبارات أخرى.

يتم قراءة نتيجة كل تفاعل طبقاً لجدول المطابقة ويتم تعريف
الجراثيم بعد الرجوع إلى فهرس التعريف Analytical Profile Index ، أو
باستخدام برنامج كمبيوتر خاص .

* تحتوي مجموعة $API_{20}E$ الآتي :

- 25 شريطاً داخل كيس معدني مغلق بصورة عقيمة ، ويحفظ في درجة حرارة 2 - 8°م لمدة لا تتجاوز 10 أشهر بعد فتح الكيس المعدني للمرة الأولى (على أن يعاد إغلاق الكيس جيداً) .

- 25 علبة تحضين خاصة .

- 25 ورقة لرصد النتائج .

- دليل إرشادي .

*** ويلزمنا لاستخدام هذا النظام ما يلي :**

- بيئة تعليق معقمة سائلة (5مل) هي ماء معقم خالٍ من الأيونات، أو

ماء فيزيولوجي معقم .

- مجموعة كواشف خاصة، تحفظ في الظلام وعند درجة الحرارة

2- 8°م لمدة شهر واحد بعد فتحها .

- زيت معدني معقم .

- ماصات معقمة .

- الفهرس التحليلي الخاص بهذا النظام أو برنامج الكمبيوتر الخاص .

- تواجد بعض الاختبارات التي يمكن أن تجرى خارج النظام وتدخل

في حسابات الفهرس، مثل بيئة الأكسدة والتخمر التي نحدد بوفقها

المسار التأكسدي أو التخمري للغلوكوز. وبيئة اختبار الحركة .

مجموعة الكواشف وتركيبها :

1- كاشف TDA :

يستخدم لاختبار الإنزيم النازع لمجموعة الأمين من الحمض الأميني
التريبتوفان ، ويتكون من :

3.4 غ من كلوريد الحديدي

100 مل ماء خالٍ من الأيونات (الشوارد).

2 - الكواشف المستخدمة للكشف عن الاندول :

- كاشف JAMES ويتكون من :

0.5 غ من مركب J رقم 2183 .

ومن 1000 مل من حمض كلور الماء.

- كاشف الاندول IND ويتكون من :

5 غ بارادي ميتيل بنزالدهيد Paradimethylbenzaldehyde .

ومن 75 مل كحول ايزوإميلي .

ومن 25 مل حمض كلور الماء 37 % .

3- كواشف فوكس - بروسكاوير للكشف عن مركب الأسيتوئين Acetoin :

- VP1 ويتكون من :

40 غ من ماءات البوتاسيوم .

100 مل ماء خالٍ في الأيونات (الشوارد).

- VP2 ويتكون من :

6 غ ألفا - نافتول .

ومن 100 مل كحول ايتيلي .

4- كاشف غريس Griess للكشف عن النيتريت ويتكون من كاشفين :

- Nit 1 ويتكون من :

8 غ حمض الكبريت .

ومن 100 مل حمض الخل عيار 5 .

- Nit 2 ويتكون من :

6 غ ألفا نافثيل أمين .

ومن 100 مل حمض الخل عيار 5 .

5- كاشف الأوكسيداز :

ويتكون من 1 غ Tetramethyl-p-phenylenediamin .

ومن 100 مل كحول إيزوإميلي .

إعداد شريط API_{20E} :

1- حضر علبه الحضان، ووزع نحو 5 مل ماء معقم في تجاويف العلبه، لترطيبها.

2- سجل رقماً للجرثوم من الناحية الطويلة لعلبة الحضان .

3- ضع الشريط داخل العلبه .

4- اعمل اختبار الأوكسيداز للجرثوم المراد اختباره ، وسجل نتيجته في ورقة النتائج .

إعداد المعلق الجرثومي :

1- افتح أنبوبة بيئة التعليق المعقمة بجو عقيم .

2- بإبرة الزرع المعقمة، خذ مستعمرة نقية من الجرثوم المراد اختباره والمزروع مسبقاً على بيئة مناسبة بعمر 22-24 ساعة (شريطة ألا تكون

هذه البيئة حاوية على أصبغة أو كواشف كي لا تؤثر في النتائج)، وضعها داخل أنبوبة بيئة التعليق ورجها جيداً للحصول على معلق جرثومي متجانس. **تلقیح شريط API₂₀E :**

- 1- بالماصة المعقمة املأ بالمعلق الجرثومي الأنبوبة وقمة الأنبوبة في الاختبارات المشار إليها بمربع ناقص ، وهي CIT - VP - GEL وتمثل الجيلاتين وفوكس - بروسكاوير والسيترات .
- 2- املأ الأنابيب الأخرى دون القمة بالمعلق الجرثومي .
- 3- اجعل الظروف لاهوائية بإضافة بضع قطرات من الزيت المعدني المعقم في الاختبارات التي وضع تحتها خط وهي $H_2S - ADH - LDC - ODC - URE$.
- 4- غط العلبة واحضن عند 35 - 37°م لمدة 18 - 24 ساعة .

قراءة النتائج : (الشكل 93)

- 1- بعد مدة الحضانة اقرأ النتائج مقارنة بجدول المطابقة .
- 2- سجل نتائج الاختبارات التي يتغير لونها تلقائياً دون إضافة كواشف في ورقة النتائج .
- 3- إذا كانت نتيجة الغلوكوز موجبة ومعها ثلاثة اختبارات أو أكثر موجبة، يتم تحديد الاختبارات التي سيتم إضافة الكواشف إليها وهي: اختبار فوكس - بروسكاوير، اختبار TDA ، اختبار الاندول، واختبار الكشف عن النتريت.

(a)



(b)



الشكل 93

(a) شريط موجب - (b) شريط سالب

اختبار فوكس - بروسكاوير :

أضف قطرة واحدة من كاشف VP_1 وقطرة من كاشف VP_2 ، انتظر لمدة عشر دقائق على الأقل . يستدل على النتيجة الايجابية بظهور لون أحمر وردي فاتح ، سجل النتيجة في ورقة النتائج .

اختبار TDA :

أضف قطرة واحدة من الكاشف TDA ، يدل ظهور اللون البني الداكن على النتيجة الموجبة ، سجل النتيجة في ورقة النتائج .

اختبار الاندول IND test :

أضف قطرة واحدة من كاشف JAMES ، يتم التفاعل مباشرة ويستدل على النتيجة الموجبة بظهور اللون الوردي بقمة الأنبوبة، سجل النتيجة في ورقة النتائج . أو أضف كاشف IND وانتظر دقيقتين، يستدل على النتيجة الموجبة بظهور حلقة حمراء على سطح الأنبوبة، سجل النتيجة على ورقة النتائج .

اختبار الكشف عن النتريت NO₂ test :

أضف قطرة من كاشف NIT₁ وقطرة من كاشف NIT₂ إلى الأنبوبة التي كتب عليها GLU (أنبوبة الغلوكوز)، انتظر لمدة 2-3 دقائق ولاحظ ظهور اللون الأحمر الذي يدل على نتيجة إيجابية .

ربما يكون اللون الأصفر أيضاً نتيجة إيجابية ولكن تم اختزال النتريت (إرجاع النتريت) إلى غاز النيتروجين (الآزوت) مع ظهور فقاعات، ويجب التأكد من ذلك بإضافة 2 - 3 ملغ من عنصر التوتياء (الزنك) إلى أنبوبة الغلوكوز والانتظار لمدة خمس دقائق، إذا بقيت الأنبوبة صفراء اللون فهذا يدل على النتيجة الموجبة واختزال النترات إلى نتروجين، أما إذا تحول اللون من الأصفر إلى الوردي فهذا يدل على النتيجة السالبة وأن النترات لم تختزل بفعل الجرثوم وإنما اختزلت بفعل عنصر الزنك. سجل النتيجة في ورقة النتائج .

* إذا كانت نتيجة الغلوكوز سالبة وعدد الاختبارات التلقائية الموجبة أقل من اثنين أو يساوي ذلك فلا تضيف الكواشف ويجب عمل الاختبارات التكميلية الآتية :

1- لقح عدد أنبوبتين من بيئة Oxidation - Fermentation (O-F) وذلك للتأكد من طريقة استقلاب سكر الغلوكوز .

2- خطط المستعمرة على أطباق من بيئة ماكونكي آغار Mac Conkey .

3- لقح بيئة APIM لاختبار الحركة .

4- احضن المزارع السابقة لمدة 24 ساعة .

5- أضف الكواشف كما هو مبين سابقاً .

6- سجل نتائج الشريط بالإضافة لنتائج الاختبارات التكميلية التي ذكرت .

التعريف (تحديد اسم الجرثوم) :

1- باستخدام جداول التعريف ، قارن النتائج التي تم تسجيلها بالنتائج الموجودة في الجداول المرجعية .

2- يتم تحويل النتائج إلى أرقام ، بعد تقسيم الشريط إلى مجموعات كل ثلاثة اختبارات في مجموعة.

- الاختبار الأول من كل مجموعة يأخذ الرقم (1).

- والاختبار الثاني يأخذ الرقم (2).

- والاختبار الثالث يأخذ الرقم (4).

توضع الأرقام مقابل التفاعلات الموجبة فقط . يتم الحصول على 7

أرقام مع حساب نتيجة الأوكسيداز حيث يأخذ رقم (4) إذا كان موجباً.

في بعض الحالات تكون الأرقام السبعة غير كافية لتعريف بعض

أنواع البكتيريا ، عندئذ يجب النظر في نتيجة الاختبارات الآتية :

- اختزال النترات إلى نتريت .

- اختزال النترات إلى غاز النتروجين .

- اختبار الحركة .

- أكسدة الغلوكوز O-F .

- تخمر الغلوكوز O-F .

التخلص من الأدوات بعد الانتهاء من العمل :

يجب تلف جميع الشرائط والأنابيب وعلب الحضان بعملية التعقيم قبل التخلص منها .

ضبط الجودة : Quality control

يجب التأكد من صلاحية البيئات والكواشف المستخدمة وذلك بتجربتها على عزلات مرجعية مثل :

Klebsiella pneumoniae

NCTC 8172

Enterobacter cloacae

ATCC 13047

Proteus vulgaris

ATCC 13315

Pseudomonas aeruginosa

ATCC 10145



الفصل الثاني عشر

التغيرات والطفرات والتأشيب عند الجراثيم Bacterial Variations Mutations and Recombination

تتعرض الجراثيم مثل غيرها من الأحياء إلى تغير في صفاتها ، حتى عندما تكون في المزارع النقية ، حيث نجد داخل المجموعة الواحدة خلايا طافرة تختلف في كثير من صفاتها عن صفات الخلايا الأصلية .

وفي أثناء نمو المزرعة الجرثومية، تحدث الطفرات بمعدل منخفض جداً قد يصل إلى خلية واحدة من كل 10 مليون خلية ، محدثة بذلك اختلافاً ما عن الآباء مثل : فقدان القدرة على تخمير سكر معين، أو فقدان القدرة على تكوين توكسين معين، أو ظهور المقاومة لفعل صاد معين .

و الصفة المتغيرة تصبح صفة ثابتة تظهر في جميع الخلايا التي تنتج عن الطفرة (الأنسال)، وتعكس الصفات الموروثة من هذا النوع التي أحدثت تغيراً في النمط الشكلي phenotypic variation للجراثيم تغيرات في الجهاز الوراثي، أو ما يسمى تغيراً في النمط الجيني genotype وبهذا فإن التغير في النمط الشكلي يكون عادة تعبيراً عن تغير حدث في النمط الجيني . ومع هذا فإن التغير الملاحظ في نشاط الخلية ، قد يعزى فقط إلى مؤثرات بيئية من الوسط الذي تعيش فيه الجراثيم. فمثلاً نجد أن الخلايا قد تنتج إنزيماً يعمل على تمثيل مادة غذائية مطلوبة كحمض أميني غير متوفر في البيئة، فإذا ما وجد هذا الحمض في الوسط الذي تعيش فيه الجراثيم فقد يحدث نوع

من تنظيم إنتاج الإنزيم (التثبيط العكسي Feedback inhibition)
ويؤدي إلى إيقاف إنتاج هذا الإنزيم ، وعلى عكس الطفرة التي تحدث في
خلية واحدة من خلايا النسل progeny نجد أن التثبيط العكسي وغيره من
نظم تنظيم التمثيل يحدث في جميع خلايا المزرعة استجابة للتغيرات البيئية
وعلاوة على الطفرات ، فقد تحدث تغيرات في التركيب الوراثي للجراثيم
نتيجة انتقال مادة وراثية من خلية مانحة إلى خلية مستقبلة ، كما بينا بشكل
تفصيلي في الجزء النظري من هذا المقرر . وهناك ثلاثة أنواع من طرائق
انتقال المادة الوراثية في الجراثيم هي :

- التحول الوراثي Transformation .
- الاقتران Conjugation .
- الانتقال الوسيط (التنبغ) Transduction .

أولاً : دراسة التغيرات الجرثومية Bacterial Variation

يمكن النظر إلى الخلية الجرثومية على أساس أنها تضم مجموعة
مترابطة من الأنشطة الكيميائية القادرة على الاستجابة المرنة للظروف
البيئية . فمثلاً نجد أن مستعمرات من الجراثيم العقدية Streptococci ،
تزداد في الحجم عندما يتم إمداد المزرعة بكميات قليلة من CO_2 . كما أن
جرثوم *Lactobacillus casei* يمكن تنميته عند $pH = 5.0$. كما أن
الحاجة لإمداده بفيتامين بيريدوكسين Pyridoxine التابع لفيتامين B أما
عند $pH = 7.0$ فلا بد من إضافة البيريدوكسين للبيئة .
أغلب التفاعلات التي تؤدي إلى تغير صفة الجرثوم غير معروفة تماماً ،
ولكن من الواضح أنه يمكن أن تعزى إلى تغير في جزء من النشاط المعقد
للخلية .

وهذا التمرين يوضح التغير المؤقت في الطراز الشكلي، لتكوين الصبغة في جرثوم *Serratia marcescens* نتيجة للنمو عند درجات حرارة مختلفة .

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- أطباق بتري تحوي وسط الآغار المغذي .
 - 2- مزرعة من جرثوم *Serratia marcescens* بعمر 24 ساعة .
- طريقة العمل :

- 1- قم بإعداد طبقين بتري من بيئة الآغار المغذي ، ثم خطط الطبقين من مزرعة *Serratia marcescens* .
 - 2- احضن أحد الطبقين عند 25°م ، أو حرارة الغرفة ، والآخر عند 37°م حتى الدرس العملي التالي .
 - 3- افحص تأثير الحرارة على تكوين الصبغة ، سجل النتيجة .
- ثانياً: دراسة الحث (التحريض) الإنزيمي عند الجراثيم

Enzyme Induction

يعد تنظيم إنتاج الإنزيمات صورة أخرى من صور تغير الجراثيم، فبعض الإنزيمات أساسية (بنائية) Constitutive ، وتكون تحت جميع ظروف النمو، مثل تلك الظروف الضرورية لتمثيل الجلوكوز . وبعض الإنزيمات مستحثة (محرّضة) inducible ، أي أنها تتكون فقط في وجود مادة التفاعل، أو تحت ظروف بيئية معينة، مثل إنزيم الفوسفاتاز القاعدي alkaline phosphates ، فهو مستحث، يتكون فقط عندما يتم تجويع الخلية بالنسبة للفوسفات غير العضوية ، ويعمل فقط عند pH القاعدي.

ويمكن التحكم في نمو الجراثيم ، بالتحكم في مادة غذائية غير عضوية مثل الفوسفات. وفي هذه الحال تستجيب الخلايا فيزيولوجياً لتركيزي الفوسفات غير العضوي في الوسط المغذي، بأن يتغير إنتاجها للفوسفاتاز القاعدي (تنتجه أو توقف إنتاجه)، وهو الإنزيم الذي يحلل روابط الإستر في عدد من مركبات الفوسفات العضوية ، لينتج فوسفات غير عضوي لسد حاجة الخلية. وتوضح مثل هذه التجربة كيف أن أعداد الخلايا وتركيز الإنزيم يتغيران بتغير تركيز الفوسفات غير العضوي .

المواد والأدوات اللازمة :

- 1- أنبوب سائل من بيئة الكفاف minimal medium . هذه البيئة تحتوي كل الأملاح المعدنية المطلوبة (الأمونيوم ، الكبريتات) لنمو جرثوم *E.coli* فيما عدا الفوسفات .
 - 2- محلول فوسفات بتركيز 1000 ميكروغرام فوسفات / مل معقم .
 - 3- أنابيب فارغة معقمة .
 - 4- جهاز مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer .
 - 5- مادة بارا نيتروفينيل فوسفات Para nitro phenyl (PNPP) phosphate .
 - 6- مادة التلوين .
 - 7- حمام مائي عند الدرجة 37°م .
 - 8- محلول من مادة مولر K_2HPO_4 .
 - 9- مثقلة .
- طريقة العمل :**
- 1- قم بإعداد سلسلة من الأنابيب المعقمة كما هو موضح بالجدول رقم 7.

- 2- لاحظ النمو قبل الدرس العملي التالي بوقت قصير (حوالي 48 ساعة).
- 3- في الدرس العملي التالي ارفع الأغشية عن الأنابيب (يتم هذا العمل بدون الحاجة لإتباع شروط التعقيم) .
- 4- رج محتوى الأنابيب جيداً، وامسك الأنابيب من الخارج .
- 5- قس مستوى النمو في المزارع بقياس الامتصاص الضوئي ، في جهاز Spectrophotometer عند طول موجة 650 nm . استخدم أنبوبة ماء لتضبط صفر الجهاز .

التقدير الكمي للفوسفاتاز القاعدي : Assay of Alkaline Phosphate

يمكن تقدير الفوسفاتاز القاعدي باستخدام عدد من المواد ذات روابط إستر الفوسفات ، وتعدُّ مادة بارا نيتروفينيل فوسفات (PNPP) (Para nitro phenyl phosphate) مادة تفاعل مناسبة. وهذه المادة عديمة اللون ، بينما مادة البارا نيتروفينول Para nitro phenol التي تتفرد (تتشكل) بعد إزالة مجموعة الفوسفات بالتحلل الأنزيمي، تعطي لوناً أصفرأ واضحاً . وباستخدام مقياس الطيف الضوئي (الاسبكتروفوتومتر) مع فلتر أزرق وطول موجة 425 nm يمكن قياس نشاط المستحضر الإنزيمي بقياس اللون الأصفر الذي يتكون بعد وقت محدد من التحضين، وذلك بتقدير نشاط إنزيم الفوسفاتاز القاعدي وفق الطريقة التالية :

- 1- أضف نقطة واحدة من التولوين لكل مزرعة بقطارة زجاجية (تحذير: التولوين مادة قابلة للاشتعال)، احضن مدة 10 - 15 دقيقة عند درجة 37°م في حمام مائي . يتم في هذه المرحلة تحطيم حاجز النفاذية للخلية، حتى يمكن للإنزيم ومادة التفاعل أن تتفاعلا بحرية.

2- تدفئة محلول مادة التفاعل (محلول يحتوي على 20 ملغ / مل من PNPP) حتى الدرجة 37°م في حمام مائي . يجب أن يتم التفاعل عند درجة حرارة ثابتة لأن نشاط الإنزيم يتأثر بالحرارة بشدة ، لذلك يجب أن يتم التفاعل ضمن الحمام المائي ، كما يجب تحديد الوقت بدقة لأنه مهم في هذه التجربة .

3- أضف 0.1 مل من محلول مادة التفاعل إلى كل أنبوبة بالتتابع (انظر الجدول رقم 8) ، وعلى أوقات متساوية وبعد 5 دقائق فقط، أوقف التفاعل في كل أنبوبة، بإضافة 0.2 مل من محلول مولر K_2HPO_4 باستخدام ماصة 5 مل . ويكون هذا التركيز النهائي الناتج من الفوسفات مثبطاً قوياً لإنزيم الفوسفاتاز القاعدي .

4- أحدث طرداً مركزياً للأنايب لتخلص خلايا الجراثيم من المعلق . مع الحرص على عدم إعادة تحريك الراسب. قس الامتصاص الضوئي للمحلول الرائق باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 425 nm .

5- باستخدام أوراق الرسم البياني . اعمل ما يلي :

أ - ارسم رسماً بيانياً يوضح العلاقة بين كمية نمو الخلايا ، وبين تركيز الفوسفات غير العضوي في البيئة .

ب - ارسم رسماً بيانياً للعلاقة بين نشاط الفوسفاتاز القاعدي مقسوماً على النمو ، وبين تركيز الفوسفات .

رقم الأنبوبة								المحلول
8	7	6	5	4	3	2	1	صفر
0.6	0.4	0.3	0.2	0.15	0.1	0.075	0.05	0
								كمية محلول Na_2HPO_4 (100 ميكروغرام / مل / مل)
	4.4	4.6	4.7	4.8	4.85	4.9	5	5
								كمية محلول منظم TRIS الخالي من الفوسفات / مل
12	8	6	4	3	2	1.5	1	0
								تركيز الفوسفات النهائي ميكروغرام / مل

ثالثاً : الطفرة الجرثومية Bacterial Mutation

الطفرة Mutation هي نتيجة تبدل موروث وثابت لنتالي النكليوتيدات في الحمض الريبسي النووي DAN ، ويمكن زيادة تكرارية حدوث الطفرات بالتلاعب بمحيط الجرثوم الفيزيائي والكيميائي ، فمثلاً تؤدي المعاملة بأشعة x إلى زيادة معدل الطفرات في الخلايا .

وإذا تم وضع وملائمة الجراثيم الطافرة في البيئة التي تشكلت فيها هذه الجراثيم فإن نموها سيكون أكبر وأسرع من الجراثيم الأم التي تشكلت منها، وفي هذه الحالة فإن الجراثيم الطافرة ستصبح المسيطرة في الوسط المغذي. تحدث الطفرات بإحدى طريقتين :

- 1 - بصورة عفوية حيث تظهر في كل الجراثيم وتتطور دون إضافة أي عامل .
- 2 - بصورة مُحَرَّضَة induced (بالتحريض) نتيجة تعرض الجراثيم لعوامل مطفرة mutagen التي يمكن أن تكون كيميائية أو فيزيائية .

إن طفرات مقاومة المضادات الحيوية التي تحدث بصورة عفوية ، سهل الكشف عنها حيث إن الجراثيم المقاومة تنمو بوجود تراكيز من المضاد الحيوي تمنع نمو الجراثيم العادية .

وهذا التمرين يقوم باستخدام طريقة الأطباق ذات الكميات التدريجية
gradient – plate method من الوسط لعزل سلالات *Staphylococcus aureus* الطافرة والمقاومة للمضاد الحيوي Streptomycin .

المواد والأدوات اللازمة :

1- أطباق بتري معقمة .

2- أنبوبان يحويان 6 - 7 مل من وسط Tryptic soy agar .

3- أنبوب يحوي وسط Tryptic soy agar مع 0.05 ملغ من الـ Streptomycin .

4- مزرعة نقية من (*Staphylococcus aureus* ATCC 25903) بعمر 24 ساعة .

5- كحول إيثيلي 95 % .

6- ثلاثة أنابيب من مرق Tryptic soy .

7- أنبوبان يحويان مرق Tryptic soy مع 0.01 ملغ من Streptomycin .

8- أنبوبان يحويان مرق Tryptic soy مع 0.05 ملغ من Streptomycin .

9- عصي زجاجية أو خشبية بقطر 1.6 ملم .

طريقة العمل :

1- حضر طبقاً متدرج كمية الآغار كما يلي :

أ - ضع طبق بتري معقم مائلاً بزاوية وذلك عن طريق وضع العصا الزجاجية أو الخشبية تحت أحد جوانبه كما في (الشكل 94).

ب - صب بطريقة عقيمة أنبوباً من وسط Tryptic soy agar مصهوراً في الطبق ثم غط الطبق بسرعة (مع تجنب التلوث الجانبي) واتركه ليتصلب . ضع اسمك والتاريخ على الطبق .

ج - بعد أن تصلب الوسط قم بإزالة العصا الزجاجية أو الخشبية ، واسمح للطبق أن يصبح مستوياً على سطح المنضدة .

د - صب وبطريقة عقيمة أنبوباً من وسط Tryptic soy agar مع 0,05 ملغ من Streptomycin والمصهور عل سطح الطبق ذي الكمية المتدرجة السابقة، كما في (الشكل 94) . غط الطبق بسرعة واتركه ليتصلب.

2- ضع 0,3 مل من مستعمرة *Staphylococcus aureus* على سطح
الآغار، وقم بنشرها على كامل الوسط باستخدام سبائتول زجاجي معقم
Glass spreader.

3- اسمح للوسط أن يجف، ويمتص كمية السائل ، ثم احضن الطبق مقلوباً
بحرارة 37°م من 24 - 48 ساعة .

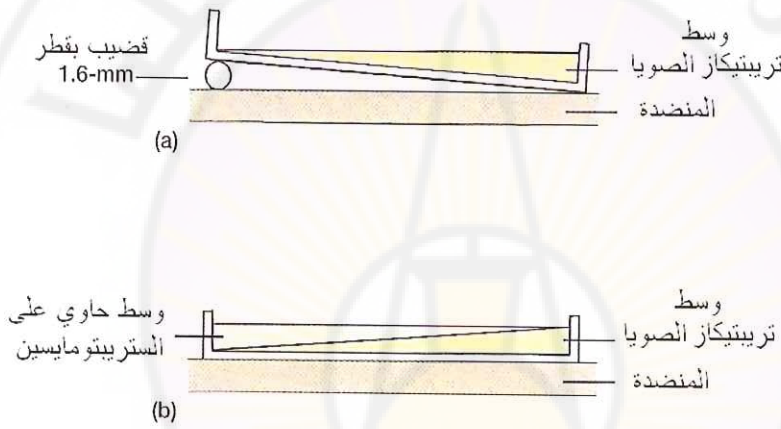
4- راقب الطبق متدرج كمية الأغار لتلاحظ نمو مستعمرات الجرثوم مقارنة في المنطقة ذات التركيز الأعلى من المضاد الحيوي الستربتوميسين .

5- سجل نتائجك في تقرير .

6- لُحَق باستخدام مستعمرة *Staph. aureus* التي استخدمتها في البدء في وسط مرق Tryptic soy (أنبوب شاهد) ، وأنبوب يحوي بالإضافة إلى الوسط 0,01 ملغ من الستربتوميسين وآخر يحوي 0.05 ملغ منه (هذه الجراثيم تمثل *Staphylococcus aureus* الأصلية غير الطافرة) .

7- بالطريقة نفسها وباستعمال إبرة تلقيح معقمة ، قم بعمل معلق جرثومي (على وسط مرق Tryptic soy) من المستعمرات النامية في المنطقة ذات

- التركيز الأعلى من المضاد الحيوي في الطبقة متدرج كمية الآغار . ثم قم بتلقيح ثلاثة أنابيب كما في الفقرة رقم 6 بالمعلق الجرثومي الذي تم تجهيزه من الطبقة متدرج كمية الآغار (هذه ستمثل الجراثيم الطافرة أو المقاومة) .
- 8- احضن هذه الأنابيب بحرارة 37°م لمدة 24 - 48 ساعة .
- 9- راقب الأنابيب السابقة، وقارن النمو فيها مع الأنابيب الشاهدة .
- 10- دون النتائج في تقرير .



الشكل 94

طريقة تجهيز الطبقة متدرج كمية الآغار

رابعاً : التحويل الجرثومي Bacterial Transformation

التحول Transformation وهو تلقف جرثوم مستقبل لجزيئة أو شدة DNA عارية من وسط زرعى، وإدخال هذه الجزيئة أو الشدة في صبغى الجرثوم المستقبل بصورة قابلة للتوريث .

في التحول الطبيعي، يأتي DNA من جرثوم معطٍ ، وهذه الخلية عشوائية وأي قطعة من الجينوم يمكن أن تنقل بين الجراثيم . عند انحلال الجراثيم يتحرر كميات لا بأس بها من DNA في الوسط المحيط . وهذه الشداف قد تكون كبيرة نسبياً وتحمل جينات (مورثات) عديدة . وفي حال التقت هذه الشداف مع جراثيم ذات قابلية وقدرة على التقاف DNA ، فإنها ترتبط بالخلية ويتم إدخالها ، وإن التحول هو من آليات التبادل الجيني المهمة في الطبيعة .

في هذا التمرين البسيط عن التحول سنستعمل سلالة *Bacillus subtilis* النمط البري كسلالة معطية ، بينما السلالة S B 100 من نفس الجرثوم ستستخدم سلالةً مستقبلية . وهذه السلالة ظهرت بعد عدة طفرات كسلالة طافرة غيرية التغذية الكيميائية Auxotroph فهي تحتاج لنموها وجود الحموض الأمينية تيروزين - تريبتوفان - الهيستيدين في الوسط ، حيث فقدت قدرتها على اصطناع هذه الحموض. بينما السلالة البرية تستطيع اصطناعها في وسط ملحي حاوياً على الغلوكوز كسكر وحيد - Glucose minimal salts medium لا يحوي هذه الحموض .

وبمزج الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) المستخلص من السلالة البرية مع جراثيم نشيطة من السلالة غيرية التغذية الكيميائية يمكن :

1- أن نلاحظ الجراثيم المحولة Transformant التي أصبحت قادرة على النمو في غياب التريبوفان .

2- أن نلاحظ الجراثيم التي اكتسبت القدرة على اصطناع التريبتوفان التي تملك القدرة على اصطناع الهيستيدين ، التي لم تعد بحاجة لإضافة أي حمض أميني معين إلى الوسط .

المواد والأدوات اللازمة :

1- مستعمرة *Bacillus subtilis* سلالة SB 100 (ATCC 29056)

بعمر 24 ساعة في وسط مرق مغذي Nutriet broth .

2- مستعمرة *Bacillus subtilis* سلالة برية (ATCC 6051) بعمر

24 ساعة في وسط مرق مغذي Nutriet broth .

3- محلول لإنزيم الليزوزيم Lysozyme بتركيز 2 ملغ / مل .

4- طبق يحوي وسط glucose - minimal salt agar ويحوي

التيروسين Tyrosin والهيستيدين Histidine .

5- طبق يحوي وسط glucose - minimal salt agar ويحوي على

التيروسين Tyrosin والتريبتوفان Tryptophan .

6- طبقان يحويان وسط glucose - minimal salt agar ويحوي على

التيروسين Tyrosin والتريبتوفان Tryptophan والهيستيدين

Histidine .

7- طبق يحوي وسط glucose - minimal salt agar ويحوي على

الهيستيدين Histidine .

8- أنابيب اختبار معقمة .

9- بفر Buffer (وقاء) فوسفاتي معقم (pH = 6.2 ، 0.1 M) .

10- كلوروفورم . كحول إيثيلي .

11- مثقلة وأنابيب تثقيب معقمة .

- 12- عيدان خشبية معقمة .
 - 13- حمام ماء ثلجي .
 - 14- ماء مقطر معقم .
 - 15- دوارق سعة 250 مل معقمة .
 - 16- 50 مل من وسط Difco Antibiotic Assay Medium 3 في دورق سعة 250 مل .
 - 17- 15 مل من وسط MM 1 .
 - 18- 15 مل من وسط MM 2 .
- طريقة العمل :**

آ- تحضير DNA الذي سيعطى :

- 1- انقل بصورة عقيمة 5 مل من جرثوم *B. subtilis* النمط البري إلى أنبوب تنقيـل، وقم بالتنقيـل على 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق .
- 2- بعد التنقيـل أرح السائل الطافي، وقم بإعادة حل البكتريا في 5 مل من البفر الفوسفاتي العقيم .
- 3- أضف 0.05 مل من محلول الليزوزيم واحضن (مع رج لطيف) لمدة 30 دقيقة بحرارة الغرفة .
- 4- برد أنبوب التنقيـل إلى الحرارة 5°م في الحمام الثلجي .
- 5- أضف 5 قطرات من الكلوروفورم لحـل الجراثيم التي تأثرت جدرانها وضعفت نتيجة فعل هضم إنزيم الليزوزيم لها. رج الأنبوب لمزج الكلوروفورم مع الوسط . يعدُّ هذا مصدر الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA المحوّل من أجل المرحلة الثانية من العمل . وهذا المحلول يمكن الحفاظ عليه لعدة أيام بحرارة 5°م .

ب- تحضير الجراثيم القابلة للتحويل :

- 1- لقح بصورة عقيمة جزءاً من جراثيم *Bacillus subtilis* سلالة SB 100 في دورق 250 مل يحوي وسط Difco Antibiotic Assay Medium 3 .
- 2- احضن لمدة 24 ساعة على حرارة 37°م . يجب رج الوسط بصورة لطيفة .

- متابعة تحضير الجراثيم القابلة للتحويل :

- 1- قم بجمع الجراثيم بالتثقيف على 5000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم أعد تعليقه في 15 مل من وسط M M 1 .
 - 2- انقل 12.5 مل من الوسط المعلق إلى دورق 250 مل معقم واحضن مع الرج لمدة 5 ساعات .
 - 3- اجمع هذه الجراثيم بالتثقيف، ثم قم بحجم يساوي خمسة أضعافهم وذلك بإضافة 15 مل من الوسط M M 2 (وسط التحويل) . هذه هي الجراثيم المحولة التي ستستعمل في الاختبار .
- ### تحويل الجراثيم ذات القابلية :

- 1- بصورة عقيمة انقل 0.9 مل من الجراثيم القابلة للتحويل *B. subtilis* SB100 إلى أنبوب اختبار عقيم، ثم أضف بحذر وبدون الكلوروفورم 0.1 مل من DNA المانح والمحضر مسبقاً من السلالة البرية . (حيث تبدو طبقة DNA البيضاء على السطح الفاصل بين الماء والكلوروفورم) .
- 2- احضن في 37°م لمدة 30 دقيقة مع الرج اللطيف .
- 3- انقل 0.1 مل من محلول التحويل إلى طبق يحوي وسطاً ملحياً أحادي السكر الغلوكوز glucose - minimal salt agar الحاوي على التيروزين

والتريبتوفان والهيستودين . انشر الجراثيم على سطح الطبق . سمّ الطبق مع التاريخ واسم الحمض الأميني .

4- مدد محلول التحويل إلى 1 / 10 باستعمال ماء مقطر عقيم . انقل 0.1 مل من المحلول الممدد إلى طبق يحوي وسط ملحي أحادي السكر الغلوكوز يحوي مزيج من التريبتوفان والتيروسين والهيستيدين . انشر الجراثيم ، سم الطبق وضع التاريخ واسم الحموض الأمينية .

5- احضن على 37°م لمدة 48 - 72 ساعة .

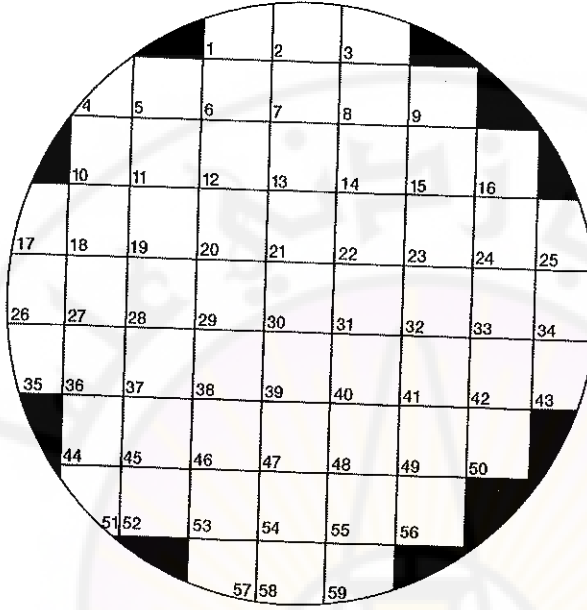
6- باستعمال عيدان خشبية معقمة ، انقل 59 مستعمرة معزولة جيداً من طبق البتري المحوّل إلى أربعة أطباق تحوي وسطاً ملحياً وحيد السكر الغلوكوز وتحوي على التالي : أ - تيروزين وهيستيدين - ب - تيروزين وتريبتوفان - ج - تيروزين وتريبتوفان وهيستيدين - د - فقط الهيستيدين .

ثم استعمل طريقة الشبكات (المربعات) الموضحة في الشكل 95 بالنسبة للأطباق قياس 90 ملم كقالب لكل من الأطباق الثلاثة. انقل كل مستعمرة معزولة جيداً بعود خشبي عقيم إلى مربع واحد في كل من الأطباق الثلاثة (مثلاً المستعمرة الأولى إلى المربع رقم 1 في كل من الأطباق الثلاثة، المستعمرة الثانية إلى المربع رقم 2 في كل من الأطباق الثلاثة وهكذا حتى يتم تلقیح الـ 59 مربع) انتبه إلى عدم الاقتراب من حواف المربعات في أثناء التلقيح .

7- إن طبق التيروسين والتريبتوفان والهيستيدين يُعدّ شاهداً ، ففي حال عدم وجود نمو على الطبق فإن البيانات المستقاة من باقي الأطباق الثلاثة يجب إهمالها.

8- احضن الأطباق الأربعة السابقة على 37°م لمدة 48 ساعة .

9- سجل نتائج المربعات حيث ندون نمو الجراثيم المحوّلة بإشارة (+) وعدم النمو بإشارة (-) .



الشكل 95
شبكة المربعات

خامساً : الاقتران الجرثومي : انتقال بلاسميدات المقاومة للصادات الحيوية
: The Transfer of Antibiotic – Bacterial Conjugation
Resistant Plasmid الاقتران يعبر عن الالتقاء Mating بين
جرثومتين، عندما يتم نقل جزء من صبغي من جرثومة لأخرى. ولحدوث
هذا الاقتران لابد من وجود اتصال فيزيائي مباشر بين الجراثيم، وإن
الاقتران الفعلي بين الواهب (المانح) و المتلقي (المستقبل) متعلق بإنتاج
زوائد خاصة تسمى الأهداب الجنسية Sex pili في الجراثيم المانحة .

وبما أن الجينات المرّمة لتشكيل هذه الأهداب الجنسية هي جزء متداخل في DNA البلاسميد فإن البلاسميدات أنفسهم يحددون قابلية انتقالهم بين الجراثيم .

البلاسميد Plasmid : جزيئة DNA ثنائية السلسلة، دائرية وصغيرة، يمكن أن تقوم بدور عناصر خارج صبغية (فهي تحمل معلومات وراثية وتبدو مستقلة عن الصبغي) . تتكاثر بصورة مستقلة عن الجينوم والعديد منها يمكن أن يتداخل مع تكاثر الجينوم .

البلاسميدات التي تدخل في عملية الاقتران بين الجراثيم تسمى بلاسميدات اقترانية Conjugative plasmid وتحمل مورثات ترمز لقدرة هذه البلاسميدات نفسها على الانتقال من الجرثومة المضيفة الواهبة إلى جرثومة أخرى مستقبلة ومناسبة بالاقتران .

البلاسميد المستعمل في هذه التجربة يحمل جين مقاومة الكلورامفينيكول ويمكنه الانتقال في أثناء الاقتران الجرثومي.

تتطلب التجربة آلية في المرق Broth من أجل الالتقاء الصناعي في الزجاج In vitro . وبما أن الاقتران يتطلب اتصال خلية بخلية فهو يوصف على أنه عملية مرتبطة بالتصادم أو الالتقاء Collision – dependent , وفي هذه التجربة لابد من توفير الوقت اللازم من أجل تأمين الالتقاء الخلوي.

في هذه التجربة تستعمل السلالة *E. coli* J-53R المتلقية أو المستقبلة، وهي غيرية التغذية الكيميائية (Auxotrophic) فهي طافرة وتحتاج عوامل نمو خاصة (فهي تحتاج بعض الحموض الأمينية مثل الميثيونين Methionine والبرولين Proline ، وهي تحمل أيضاً مورثة صبغية

لمقاومة الريفامبين Rifampin . والسلالة الأخرى *E. coli* HT-99
وتستعمل كسلالة مانحة Donor فهي برية مقاومة للكلورامفينيكول
chloramphenicol وهذه المقاومة متوضعة على بلاسميد اقتراني .
وبهذه التجربة البسيطة يتم توضيح أساس لبحث في الهندسة الوراثية
. Genetic engineering

المواد والأدوات اللازمة :

1- مزرعة سائلة من *Escherichia coli* في وسط Tryptic soy
broth من السلالة J-53R المستقبلة (Wards number 85W1686)
مضى عليها 24 ساعة .

2- مزرعة سائلة من *Escherichia coli* في وسط Tryptic soy
broth من السلالة HT-99 المستقبلة (Wards number 85W1684)
مضى عليها 24 ساعة .

3- 5 مل وسط مرق مغذٍ معقم Nutrient broth في أنابيب معقمة .

4- طبق يحوي وسط Tryptic agar يحوي 25 ملغ / مل من
الكلورامفينيكول .

5- طبق يحوي وسط Tryptic agar يحوي 100 ملغ / مل من
الريفامبين .

6- طبق يحوي وسط Tryptic agar يحوي 25 ملغ / مل من
الكلورامفينيكول و 100 ملغ / مل من الريفامبين .

7- سبائات زجاجية معقمة .

طريقة العمل :

1- حضر مزيج الالتقاء وذلك بنقل 0.1 مل بطريقة عقيمة من مستعمرة *E. coli* HT-99 في وسط *T. soy* بعمر 24 ساعة (تمثل السلالة المانحة) ونقل 0.9 مل بطريقة عقيمة من مستعمرة *E. coli* J-53R في وسط *T. soy* بعمر 24 ساعة (تمثل السلالة المستقبلة) ، إلى 5 مل من مرق *T. soy* العقيم ، كما في (الشكل 96) .

2- امزج واحضن في 37°م لمدة 3 ساعات أو ليلة كاملة .

3- أكد حالة المقاومة الصادية لكل من المانح والمستقبل بزرعهم في أطباق بتري تحوي مضادات حيوية كما يلي :

أ - قسم الأطباق الحاوية على كلورامفينيكول والأطباق الحاوية على الريفامبين إلى قسمين بقلم شمع أسفل الطبق .

ب - انقل قطرة واحدة بصورة عقيمة من مستعمرة السلالة المانحة إلى نصف واحد من طبق حاوٍ على الكلورامفينيكول ، وقطرة أخرى إلى نصف واحد من طبق حاوٍ على الريفامبين. انشر بحذر على كامل نصف الطبق باستعمال سباتيول زجاجي معقماً. انقل بنفس الطريقة قطرة من مستعمرة من السلالة المستقبلة إلى النصف الآخر من الطبق الحاوي على الكلورامفينيكول ، وقطرة أخرى إلى النصف الآخر من الطبق الحاوي على الريفامبين. أنشُرْ ، وسمِّ ، وأرَّخ واترك الأطباق قليلاً لتجف ثم ضع الأطباق في علبة خاصة واحضنهم بصورة مقلوبة على 37°م 24 ساعة.

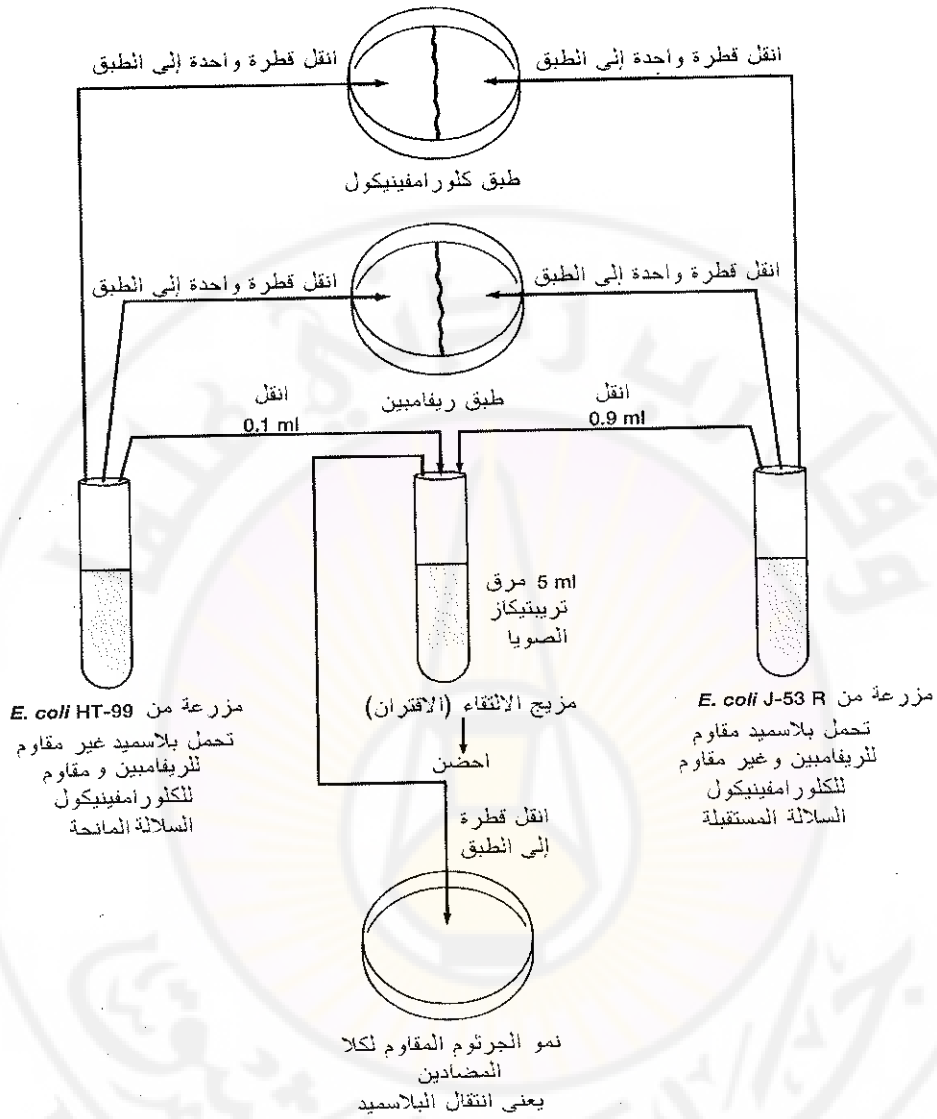
4- أخرج مزيج الاقتران من الحاضنة بعد انقضاء الفترة المطلوبة . انقل قطرة واحدة إلى منتصف طبق بتري الحاوي على كل من المضادين الحيويين الكلورامفينيكول والريفامبين ، انشر القطرة بعقامة ، سمِّ و أرَّخ

الطبق ثم احضن بالوضع المقلوب بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة في علبة الأطباق .

5- افحص الأطباق كلها لمشاهدة النمو بعد انقضاء 24 ساعة. سجل النتائج في تقرير .

6- بما أن السلالة المانحة مقاومة للكلورامفينيكول وحساسة للريفامبين، فهي ستتمو بوجود الكلورامفينيكول ولن تنمو بوجود الريفامبين (وهذا ما سيلاحظه). عكس السلالة المستقبلة الحساسة للكلورامفينيكول والمقاومة للريفامبين التي ستتمو بوجود الريفامبين ولن تنمو بوجود الكلورامفينيكول. ولا يمكن لكلا السلالتين المانحة والمتلقية أن تنمو بوجود الكلورامفينيكول والريفامبين معاً ، لأن كل من السلالتين مثبطة بفعل أحد المضادين الحيويين، فالمستعمرات النامية على سطح طبق بتري الحاوي على المضادين الحيويين المحضر بالخطوة 4 هو نمو لجراثيم اقترانية خارجياً Exconjugant bacteria ظهرت بفعل الانتقال الاقتراني لبلاسميد مقاومة الكلورامفينيكول من الجرثومة المانحة إلى المتلقية . هذه الجراثيم ناتجة عن الهندسة الوراثية الطبيعية في الكائن الحي In vivo وهي جراثيم جديدة جينياً .

7- عد المستعمرات الجرثومية ذات المقاومة المضاعفة المتشكلة. يمكن دراسة أوقات مختلفة للالتقاء Mating من 1 ساعة إلى 24 ساعة ومن ثم دراسة أفضل زمن للالتقاء بعد النُمُوّات الظاهرة على الأطباق.



الشكل 96

مخطط يوضح طريقة إجراء مراحل العمل لدراسة انتقال البلاسميدات

سادساً : استخلاص DNA من خميرة البيرة (الخبز)

Isolation of Genomic DNA from *Saccharomyces cerevisiae*

يُعدُّ استخلاص DNA خطوة أولى في عملية التحليل الوراثي . وله التركيب نفسه سواء في الخميرة أم في الجراثيم أم في الإنسان، ولكن ما يختلف هو تباينه وترتيبه . ولابد من معرفة التطبيقات التي سنستعمل فيها هذا الحمض لاختيار آلية الاستخلاص المناسبة . وماذا نريد ؟ هل نريد DNA بلاسميد أم نريد DNA جينومي ؟ هل نستخلصه من خلية جرثومية أم من كائن متعدد الخلايا ؟ هل سنستعمله من أجل تبصيم Southern blotting أم لتفاعل البوليميراز التسلسلي PCR أم ؟ وهذه الطريقة تستعمل لاستخلاص DNA الجينومي من الخميرة ، وهي سريعة، سهلة، رخيصة، ويمكن استعمالها مصدراً لجزيئات DNA للطلاب.

الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA هو المادة الوراثية التي تعطي الفرد صفاته الموروثة، وإن البنية الأساسية لهذا الحمض هي واحدة في كل الأفراد. فهو يتألف من سلسلتين من النكليوتيدات مرتبطة ببعضها بشكل حلزون مضاعف. يتألف كل نكليوتيد من سكر منقوص الأوكسجين وزمرة فوسفاتية وواحد من إحدى أربع أسس آزوتية: الأدينين ويرتبط مع التيمين والسيتوزين ويرتبط مع الغوانين، حيث تربط بينهم روابط هيدروجينية .

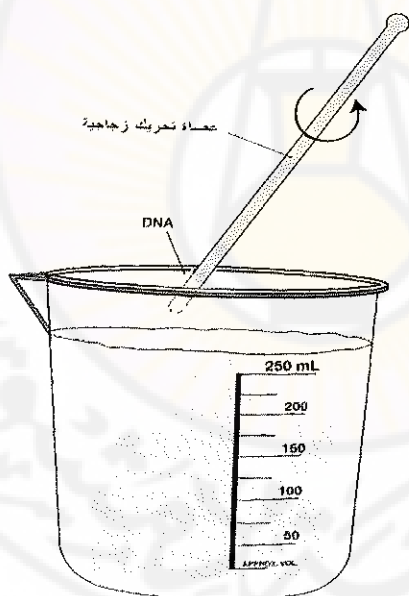
إن لف خيط DNA على عصى زجاجية (كما في 97) هو طريقة شائعة جداً لاستخلاص DNA حالما يتم فصله من محلول مائي بواسطة

الإيتانول. وإن السبب في كون كمية DNA الناتج من الخميرة كبيراً هو أن حجم جينومها يعادل 1.3×10^7 زوج أساس مقارنة بالجراثيم التي حجم جينومها يعادل 4.7×10^6 زوج أساس .
المواد والأدوات اللازمة :

- 1- قضيب أو عصا زجاجية معقمة .
 - 2- خميرة خبز مجففة أو *Saccharomyces cerevisiae* YPH499(ATCC # 76625) .
 - 3- إيتانول 95 % .
 - 4- ماء صنبور بدرجة حرارة 50 - 60°م .
 - 5- منظف أواني سائل مركز .
 - 6- محلّ للحم Adolph .
- طريقة العمل :

- 1- قم بأخذ 100 مل من ماء الصنبور بدرجة حرارة 50 - 60°م في بيشر 250 مل .
- 2- ضع نصف عبوة من خميرة الخبز الجافة في ماء الصنبور وحرك حتى تمام الانحلال .
- 3- احضن 5 - 15 دقيقة في حرارة 50 - 60°م ليتم تنشيط الخميرة.
- 4- ضع 15 مل من المنظف المركز، حرك بين مدة وأخرى لمدة 5 دقائق مع إبقاء المعلق دافئاً (المنظف يحل الغشاء السيللوزي لخلايا الخميرة محرراً محتوى الخلية بما في ذلك DNA ليصبح هذا الحمض حرّاً في المحلول المائي).

- 5- أضيف 3 غ من محلّ اللحم وحرك (يحوي محلّ اللحم على إنزيمات حالة للبروتينات Papain التي تهضم البروتينات الخلوية) .
- 6- احضن في حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة .
- 7- ضع بالماصة 10-15 مل إيتانول 95 % وبحذر على جدران البيشر حتى يشكل الإيتانول طبقة فوق مزيج الخميرة المحلّلة . الكحول سيسمح بتشكيل طبقة واضحة على سطح الكحول والمزيج الخلوي (الإيتانول 95% سيحلله DNA وسيفصله عن السائل).
- 8- أدخل قضيب زجاجي في الإيتانول حتى المزيج الخلوي ، ودوّرها. لكن لا تمزج الطبقتين معاً .



الشكل 97

لاحظ خيط الـ DNA الملفوف على العصا الزجاجية

- 9- سيلتصق الحمض DNA على القضيب الزجاجي على شكل خيوط بيضاء كما في (الشكل 97) لكن بهذه الطريقة البسيطة سيبقى حمض DNA ممزوجاً ببعض البروتينات الخلوية .
- 10- خذ الحمض عن القضيب وحدد وزنه بالملغ .

سابعاً : استخلاص الـ DNA من العصية المعوية وتنقيته

Escherichia coli Isolation and Purification of Genomic DNA from *Escherichia coli*

إن استخلاص وتنقية DNA أساس العمل في البيولوجيا الجزيئية، وإن استفراد وتنقية الحمض DNA الجينومي من الكائنات بدائية النوى مثل الـ *E. coli* قد سهل دراسة الجينومات المعقدة ، وقد أسهم أيضاً في بناء المكتبات الجينومية من الحمض DNA لعدة أنواع . وإن آلية استفراد وتنقية الحمض DNA المستعملة في هذه التجربة مؤلفة من أربع خطوات :

1- يجب حل خلايا *E. coli* لتحرير DNA الجينومي، وأشهر المحاليل منظفات سلفات دودوسيل الصوديوم وهيدروكسيد الصوديوم .

2- يضاف لمحلول الخلايا الجرثومية الريبونوكلياز Ribonuclease للتخلص من الحمض الريبوي RNA .

3- يتم إزالة البروتينات الجرثومية بإضافة أسيتات الصوديوم أو أسيتات الأمونيوم ، إذ إن الأسيتات ترسب البروتين وتبقى DNA الجينومي الضخم في المحلول .

4- يتم تركيز وفصل DNA الجينومي *E. coli* باستعمال الترسيب بالايذوبروبانول ثم يتبعه غسيل بالايثانول .

المواد والأدوات اللازمة :

1- مزرعة *E. coli* (ATCC 1122 a) على مرق Tryptic soy broth
بعمر 10 - 12 ساعة في الطور اللوغاريتمي، ويمكن الحفاظ عليها في
الطور اللوغاريتمي بغمرها في حمام ثلجي .

2- أنابيب تثقيل ومثقلة .

3- إيتانول 70 % - إيتانول 100 % - إيزوبروبانول 100 % .

4- محلول مرسب للبروتين (أسيتات الأمونيوم) .

5- ريبونكلياز RNase بتركيز 20 ملغ / مل .

6- محلول حال للخلايا Cell lysate .

7- محلول إمهاء .

8- حمام مائي بدرجة حرارة 65°م .

9- حمام جاف بدرجة حرارة 80°م وآخر بدرجة 37°م .

طريقة العمل :

1- انقل 1 مل من المزرعة الجرثومية إلى أنبوب تثقيل وسمه .

2- ثقل الأنبوب على أعلى سرعة لمدة 5 - 10 ثوان لتحصل على رسابة

جرثومية من جراثيم *E. coli* .

3- أزل السائل الطافي وانقله إلى أنبوب يحوي إيتانول 70 % (يستخدم هنا

مطهرًا) .

4- ضع فوق الرسابة الجرثومية الباقية في الأنبوب 600 مل من محلول حلّ

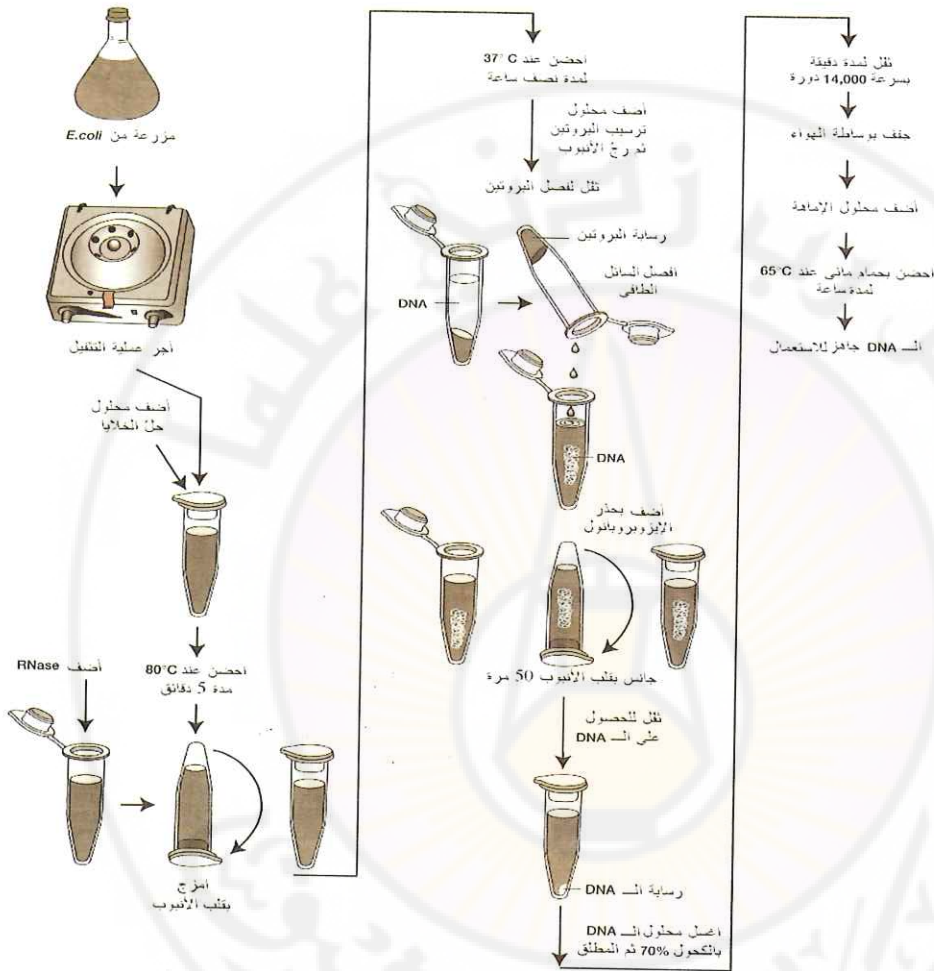
الخلايا، وامزجه مع الرسابة بالميكروبيبيت . (إن مادة SDS الموجودة في

محلول الحلّ هي منظف قادر على اختراق وتخريب العشاء البلاسمي لخلايا

الجرثوم) .

- 5- احضن على درجة 80°م لمدة 5 دقائق .
- 6- اترك الأنبوب ليبرد في حرارة الغرفة . ثم أضف 3 مل من محلول الريبونوكلياز إلى المحلول الجرثومي (يجب أن تكون حرارة الأنبوب مماثلة لحرارة الغرفة قبل إضافة الريبونوكلياز، لأن الحرارة تقوم بتمسيخ أو تخريب Denature الإنزيم) .
- 7- امزج بقلب الأنبوب (أنبوب التثقيب) 25 مرة ، ثم احضن على الدرجة 37°م لمدة 30 دقيقة .
- 8- برد إلى درجة حرارة الغرفة ، ثم أضف 200 مل من محلول ترسيب البروتين ورج الأنبوب برفعه وخفضه لمدة 20 ثانية . إن أسيتات الأمونيوم في المحلول سترسب البروتين تاركة DNA في السائل الطافي .
- 9- ثقل العينة لمدة 3 دقائق على 14000 دورة / دقيقة لتحصل على رسابة بروتينية .
- 10- انقل السائل الطافي (الحاوي DNA) إلى أنبوب سعة 1.5 مل نظيف وارمي الرسابة البروتينية .
- 11- أضف 600 مل من ايزوبروبانول 100% ، غط الأنبوب ، امزج برفق بقلبه حوالي 50 مرة . (المزج العنيف سيحطم DNA إلى شدف صغيرة) .
- 12- ثقل على 14000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة لتحصل على رسابة DNA .
- 13- ارم السائل الطافي . ستبدو الرسابة بيضاء شاحبة إلى مصفرة .
- 14- أضف 600 مل من الايتانول 70 % وامزج بالقلب عدة مرات لتغسل رسابة الحمض DNA ، ارم الايتانول 70% وأضف الايتانول المطلق

100% ، اقلب عدة مرات لغسل رسابة DNA (يستعمل الكحول لإزالة
الأملاح من DNA) .



الشكل 98

يوضح الشكل مراحل العمل المختلفة لاستخلاص DNA الجينومي من *E. coli*

15- ثقل على 1400 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة . ارم السائل الطافي برفق وحذر وعلى مهل ، ولاحظ الرسابة الباقية في الأسفل التي لم تخرج من الأنبوب .

16- جفف هذه الرسابة بالهواء لمدة 15 دقيقة على الأقل لإزالة أي باقي من الكحول الذي يمكن أن يؤثر في التحاليل اللاحقة .

17- أضف 100 مل من محلول الإمهاء للرسابة واترك الأنبوب في حمام مائي 65°م لمدة ساعة ، أو احضن في حرارة الغرفة ليلة كاملة . (الشكل 98)

- إن حمض DNA من *E. coli* جاهز للاستعمال ، ويمكن استعماله لأي من التجارب مثل :

أ - التضخيم بتفاعل البوليميراز التسلسلي PCR .

ب - تحديد كميته بالمقياس الطيفي الضوئي Spectrophotometer .

ج - تحليل الـ RFLP .

د - التبعصيم Southern blotting .



دليل الأوساط الغذائية

CULTURE MEDIA

أولاً: الأوساط الزرعية السائلة

المرق المغذي : Nutrient broth :

المكونات:

- 5 غ مستخلص اللحم .
- 10 غ ببتون (هضمون) Peptone .
- 5 غ ملح الطعام NaCl .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات وتوزع في أنابيب بمعدل 5 مل لكل أنبوب وتعقم بالصاد الموصد مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م .

في حال عدم توفر مستخلص اللحم يمكن تحضيره بالشكل الآتي :

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 لكل 1000 مل من خلاصة اللحم 10 غ من الببتون و 5 غ من ملح الطعام . نضبط درجة pH على 7.6 ثم نعقم لمدة 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 لمدة 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 بالنسبة للبيتون (الهضمون) فهو يحضر من قبل العديد من المعامل ويستحصل إما من تهضم اللحم البقري بالببسين أو التريسين (فيسمى التريبتون) أو بمواد أخرى. وقد يكون البروتين المستخدم من مصدر حيواني أو نباتي مثل لحم البقر أو نبات الصويا الخ .

مرق البيتون الفيزيولوجي أو الماء الهضموني :

المكونات :

بيتون .	10 غ
NaCl .	5 غ
ماء مقطر .	1000 مل

طريقة التحضير:

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7 - 7.2 ، يوزع في أنابيب ويعقم بالصاد الموصد عند الدرجة 121°م لمدة 20 دقيقة . هذا الوسط يستعمل غالباً لدراسة تخمر السكريات وإنتاج الاندول . في حال استعماله لدراسة تخمر السكريات نضيف إليه مشعر لدرجة الحموضة (لدرجة pH) مثل أزرق البروم تيمول أو أحمر الفينول، والسكر المراد دراسته بنسبة تتراوح بين 0.5 - 5% . ويمكن تنكيس أنبوب Durham بداخل أنبوب المرق لمراقبة انطلاق الغاز، ثم يعقم .

مرق تريبتيكاز الصويا Trypticase (Tryptic) Soy :

المكونات :

- 17 غ تريبتون Tryptone .
- 3 غ بيتون 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 البيبتون والفوسفات (وسط كلارك- لوبس Clark - Lubs):

هو وسط خاص لاختبار V.P فوكس - بروسكاوير - Voges - Proskauer واختبار تفاعل حمرة الميثيل Rm . ويسمى أيضاً - MR VP media .

المكونات :

- 7 غ بيتون .
- 5 غ فوسفات ثنائية البوتاسيوم HK_2PO_4 .
- 5 غ غلوكوز .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 6.8 ثم يوزع في أنابيب ويعقم مدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م .

مرق اللاكتوز Lactose broth :

المكونات :

- 3 غ مستخلص اللحم (أو يحضر كما ورد بتحضير وسط المرق المغذي).
- 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 بداخل كل أنبوب أنبوبة دورهام Durham 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 .

مرق دكستروز تريبتون مع بروم كريزول الأرجواني : Dextrose Tryptone bromocresol purple broth

المكونات :

- 10 غ تريبتون .
- 5 غ ديكستروز .
- 0.04 غ بروم كريزول الأرجواني .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير : تمزج المكونات وتوزع في أنابيب وتعقم .

مرق الكبد Liver broth :

المكونات :

- 1 لتر مستخلص الكبد .
- 10 غ بيتون .
- 1 غ فوسفات ثنائية البوتاسيوم HK_2PO_4 .

طريقة التحضير :

يحضر مستخلص الكبد بغلي 500 غ من الكبد البقري المفروم جيداً في 1 ليتر من الماء المقطر لمدة ساعة كاملة، ثم يضبط pH على الدرجة 7.0 ، ثم يغلي ثانية لمدة 10 دقائق، ثم يرشح، وتكمل الرشاحة إلى 1 ليتر . توزع في أنابيب، وتعقم عند الدرجة 121°م لمدة 20 دقيقة .

مرق ماكونكي أحادي التركيز Mac Conkey :

المكونات :

- 5 غ توركولات الصوديوم أو تورغليكولات الصوديوم أو أي ملح صفراوي مناسب .
- 10 غ لاکتوز .
- 20 غ بيتون .
- 5 غ كلور الصوديوم .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تذاب المواد السابقة عدا اللاكتوز في الماء الساخن ويسخن المزيج على البخار لمدة ساعتين ثم يبرد ويترك في البراد لليوم التالي ، ثم يضاف إليه اللاكتوز ويرشح ويضبط pH الوسط على 7.4 ثم يضاف 5 مل من محلول مائي للأحمر المعتدل بنسبة 1 % أو 1 مل من محلول كحولي 1 % من أرجواني بروم الكريزول . يوزع المحلول في أنابيب ويعقم بالدرجة 115°م لمدة 15 دقيقة .

مرق البولة المغذي Urea broth أو وسط Christensen : المكونات :

1 غ	بيتون .
5 غ	NaCl .
2 غ	فوسفات أحادية البوتاسيوم .
1 غ	غلوكوز .
0.012 غ	أحمر الفينول .
20 غ	بولة .
1000 مل	ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تخلط جميع المكونات ماعدا البولة، وتعقم، ثم تترك لتبرد حتى الدرجة 45°م. تذاب البولة في 50-100 مل ماء مقطر، وتعقم بالترشيح، ثم تضاف لباقي مكونات الوسط بشروط عقيمة ، يضبط pH الوسط عند الدرجة 6.8 - 6.9 ، توزع في أنابيب معقمة مسبقاً بمعدل 1 - 2 مل لكل أنبوب.

مرق النترات المغذي :

المكونات :

1- ليتر	مرق مغذ .
5 غ	نترات الصوديوم أو نترات البوتاسيوم .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات وتوزع في أنابيب وتعقم بالصاد الموصد عند الدرجة 121°م لمدة 20 دقيقة .

وسط السكريات ومشعر الحموضة :

B.C.P. Carbohydrate medium

المكونات :

غلوكوز أو لاكتوز .	- 5 غ
بيتون .	- 10 غ
مستخلص الخميرة .	- 5 غ
فوسفات أحادية البوتاسيوم .	- 2 غ
ماء مقطر .	- 1000 مل
مشعر بروم كريزول الأرجواني .	- 2 مل

طريقة التحضير :

تمزج المكونات, وتوزع في أنابيب وتعقم بالصاد الموصد عند الدرجة 121°م لمدة 20 دقيقة .

يمكن إضافة 15 غ من مادة الآغار, فنحصل على وسط صلب .

ثانياً: الأوساط الآغارية الصلبة

الآغار المغذي Nutrient agar :

المكونات :

- 1 لتر مرق مغذي .
- 15 غ آغار .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً ، ثم يهيا الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

الجيلاتيني المغذي Nutrient Gelatin :

المكونات :

- 1 لتر مرق مغذٍ .
- 120 غ مسحوق الجيلاتين .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الجيلاتين وتتحل تماماً، ثم يهيا الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

آغار تريبتيكاز الصويا Trypticase (Tryptic) Soy :

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 مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً ، ثم يهيا الوسط حسب المطلوب. فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، أو أن يعقم، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م، ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

وسط الحليب الآغاري:

المكونات :

5 غ	مستخلص الخميرة .
-----	------------------

- 1 غ 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 مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تنفتح حبات الآغار وتنحل تماماً ، ثم يعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ويترك ليبرد حتى الدرجة 45°م حيث يضاف إليه الحليب المعقم بشروط عقيمة ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

وسط آغار ايوزين 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 مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تنفتح حبات الآغار وتنحل تماماً ، ثم يوزع في دوارق بمقدار 100 مل لكل دورق ويعقم بالصاد الموصد لمدة 30 دقيقة عند الدرجة

121°م ، وعند الاستعمال تذاب الدوارق ويضاف لكل دورق (أي لكل 100 مل) ما يلي :

- 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 لمدة 5 دقائق، ثم تبرد حتى الدرجة 50°م، وتوزع في أطباق بتري معقمة.

وسط آغار ماكونكي Mac Conkey agar :

المكونات :

- 5 غ توركولات الصوديوم أو أي ملح صفراوي مناسب .
- 20 غ بيتون .
- 5 غ ملح الطعام NaCl .
- 20 غ آغار .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي غال لمدة 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 لترات من الوسط . يعقم لمدة 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 لمدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م ، يترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة .

وسط النشاء الآغاري Starch agar :

المكونات :

- 1 غ - 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 لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

وسط الدم الآغاري Blood agar medium :

المكونات :

- 5 غ - مستخلص لحم البقر .
- 15 غ - تريبتون .
- 5 غ - ملح كلور الصوديوم .
- 15 غ - آغار .
- 1000 مل - ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً، ثم يوزع في دوارق بمقدار 100 مل لكل دورق، ويعقم بالصاد الموصد لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، وعند الاستعمال تذاب الدوارق، وتبرد حتى الدرجة 45°م ويضاف لكل دورق (أي لكل 100 مل) 5 مل من دم الخروف أو دم الحصان (بشكل عقيم) ، تمزج جيداً وتصب في أطباق بتري معقمة .

ملاحظة : يمكن أن نحضر بالطريقة نفسها وسط الدم المطبوخ ، على أن يضاف الدم للوسط عند درجة حرارة 80°م مما يؤدي لانفجار الكريات الحمراء ، وتحرر عوامل النمو منها ، وأيضاً تثبيط بعض الأضداد الموجودة على سطح الكريات الحمراء، التي من شأنها تثبيط نمو بعض الجراثيم.

وسط البولة الآغاري Urea agar :

المكونات :

- 1000 مل مرق البولة قبل إضافة البولة .
- 15 غ آغار .
- 20 غ بولة .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات دون البولة ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً ، ويعقم بالصاد الموصد لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م، يبرد حتى الدرجة 45°م - 50°م

ويضاف إليه البولة المعقمة وتوزع في أنابيب معقمة مسبقاً بمعدل 1 - 2 مل لكل أنبوب .

وسط السيترات الآغاري (وسط سيمون) Simmons agar :

المكونات :

كبريتات المغنيزيوم .	0.2 غ
فوسفات وحيدة الأمونيوم .	1 غ
فوسفات ثنائية البوتاسيوم .	1 غ
سيترات الصوديوم .	1 غ
كلور الصوديوم .	5 غ
آغار .	15 غ
أزرق البروم تيمول .	0.08 غ
ماء مقطر .	1000 مل

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتنحل تماماً ، تضبط درجة pH على 6.8 ثم يهيا الوسط حسب المطلوب . فإما أن يوزع في أنابيب ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، أو أن يعقم ويترك ليبرد حتى الدرجة 50°م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة.

وسط يحوي تحت خلاات الرصاص للكشف عن انطلاق غاز H_2S :

المكونات :

- تحت خلاات الرصاص .
- وسط الآغار المغذي المصهور .
- ماء مقطر .

طريقة التحضير :

يحضر تحت خلاات الرصاص بنسبة 10/1 في الماء المقطر،
ويضاف منه للآغار المغذي المصهور بنسبة قطرتين لكل 5 مل من الآغار
المغذي ، ثم يوزع في أنابيب ويعقم.

وسط **Salmonella – Shigella S.S** :

المكونات :

- | | |
|----------------------|----------|
| مستخلص لحم البقر . | - 5 غ |
| سيترات الحديد . | - 1 غ |
| تيو سلفات الصوديوم . | - 8.5 غ |
| سيترات الصوديوم . | - 8.5 غ |
| ببتون . | - 5 غ |
| لاكتوز . | - 10 غ |
| أملاح صفراوية . | - 8.5 غ |
| الحمرة المعتدلة . | - 25 ملغ |

- 0.33 ملغ الأخضر اللامع .

- 13.5 غ آغار .

- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً ، يترك ليبرد حتى الدرجة 50 °م ثم يوزع في أطباق بتري معقمة دون أن يعقم الوسط (أي الوسط ليس بحاجة إلى تعقيم).

وسط الآغار بالفينيل آلانين :

المكونات :

- 10 غ ببتون .

- 10 غ فوسفات الصوديوم .

- 5 غ كلور الصوديوم .

- 3 غ مستخلص الخميرة .

- 2 غ فينيل آلانين DL - Phenyl - Alanine .

- 12 غ آغار .

- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار، وتتحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.2 ويوزع في أنابيب ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121 °م .

وسط يحوي على الحمض النووي DNase agar :

المكونات :

20 غ	تريبتوز .
2 غ	حمض نووي (DNA) Deoxyribonucleic acid .
5 غ	كلور الصوديوم .
12 غ	آغار .
1000 مل	ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات, بدون الحمض النووي ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً، يعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ثم يضاف الحمض النووي المعقم مسبقاً ، وتضبط درجة pH عند 7.1 – 7.5.

يستخدم هذا الوسط لتشخيص المكورات العنقودية الممرضة.

وسط كليغلر الآغاري Kligler Iron Agar :

المكونات :

3 غ	مستخلص اللحم .
3 غ	مستخلص الخميرة .
15 غ	بيتون .
5 غ	بروتيوز الببتون proteose peptone .

لاكتوز .	10 غ -
دكستروز .	1 غ -
كبريتات الحديد .	0.2 غ -
كلور الصوديوم .	5 غ -
كبريتات الصوديوم .	0.3 غ -
آغار .	12 غ -
حمرة الفينول .	0.024 غ -
ماء مقطر .	1000 مل -

طريقة التحضير :

تمزج المكونات، ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.4 ويوزع في أنابيب ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ثم يترك ليتصلب على أن يكون في الأنبوب جزء مائل وجزء قائم.

وسط الحديد ثلاثي السكار Triple Sugar Iron Agar :

المكونات :

مستخلص اللحم .	3 غ -
مستخلص الخميرة .	3 غ -
بيبتون .	15 غ -
بروتيوز الببتون proteose peptone .	5 غ -
لاكتوز .	10 غ -

سكرور .	10 غ
دكستروز .	1 غ
كبريتات الحديد .	0.2 غ
كلور الصوديوم .	5 غ
كبريتات الصوديوم .	0.3 غ
آغار .	12 غ
حمرة الفينول .	0.024 غ
ماء مقطر .	1000 مل

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار وتتحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.4 ويوزع في أنابيب ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ثم يترك ليتصلب على أن يكون في الأنبوب جزء مائل وجزء قائم.

وسط الأكسدة والتخمير

Oxidation – Fermentation (O – F) medium

المكونات :

ببتون أو تريبتون .	2 غ
كلور الصوديوم .	5 غ
فوسفات ثنائية البوتاسيوم .	3 غ
آغار .	12.5 غ

- 3 مل مشعر أزرق البروميتيمول (راجع دليل الصبغات والكواشف)
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات بدون أزرق البروميتيمول ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تنفتح حبات الأغار وتتحل تماماً ، ثم تبرد حتى الدرجة 55 °م ، ويضاف إليها البروميتيمول ، تضبط درجة الـ pH على 7.1 ، توزع في أنابيب، وتعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121 °م. تترك الأنابيب لتتصلب بالوضع المائل .

يستخدم هذا الوسط للتفريق بين أنواع الجراثيم التي تؤكسد السكاكر (التمثيل الهوائي) والأنواع التي تخمر السكاكر (التمثيل اللاهوائي) حيث يضاف السكر المراد اختباره إلى الوسط ، ويلقح أنبوبين بالجرثوم المراد دراسته، على أن يغطي أحد الأنبوبين بطبقة من زيت البرافين المعقم لجعل الظروف لاهوائية ، ويترك الأنبوب الآخر في ظروف هوائية . تحضن الأنابيب وتقرأ النتائج بانقلاب اللون.

وسط MM₁ midium :

المكونات :

- تستخدم أملاح Spizizen متمماً غذائياً في الوسط ويضاف إليها :
- 0.2 غ Vitamin – free casein hydrolysate .
 - 0.005 غ تريبتوفان L – tryptophan .
 - 5 غ دكستروز .

- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير : تمزج المكونات، وتضبط درجة pH على 7.4 ثم يعقم الوسط بالأوتوغلaf.

وسط MM₂ midium :

المكونات :

تستخدم أملاح الـ Spizizen متمماً غذائياً في الوسط ويضاف إليها :

- 0.2 غ Vitamin – free casein hydrolysate .

- 0.005 غ تريبتوفان L – tryptophan .

- 5 غ دكستروز .

- 5 غ كبريتان المغنيزيوم .

- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير : تمزج المكونات ، وتضبط درجة pH على 7.4 ثم يعقم الوسط بالأوتوغلaf.

وسط Glucose – Minimal Salts :

المكونات : جهاز المحاليل الأربعة التالية :

آ – محلول الكفاف الملحي Minimal Salts :

- 20 غ (NH₄)₂SO₄ .

- 140 غ K₂HPO₄ .

- 60 غ KH₂PO₄ .

- 10 غ sodium citrate .2H₂O .
- 2 غ MgSO₄ .7H₂O .
- 1000 مل ماء مقطر .
- تمزج المحتويات, وتعقم بالأوتوغلانف .
- ب - محلول الغلوكوز بتركيز 50 % :
- 50 غ غلوكوز .
- 100 مل ماء مقطر .
- تمزج المحتويات, وتعقم بالأوتوغلانف .
- ج - محلول الحمض الأميني :
- حضر محلول الحمض الأميني المطلوب بتركيز 2 ملغ/ مل , وعقمه بالترشيح .
- د - محلول الأغار :
- 15 غ آغار .
- 880 مل ماء مقطر .
- تمزج المحتويات, وتعقم بالأوتوغلانف .
- امزج المحاليل الأربعة السابقة على أن يكون محلول الأغار مصهوراً عند الدرجة 50° م , وذلك وفق النسب التالية :
- 880 مل من المحلول د .
- 100 مل من المحلول آ .
- 10 مل من المحلول ب .
- 10 مل من المحلول ج .

وسط خلاصة القلب والدماغ Brain Heart infusion agar :

المكونات :

مستخلص الدماغ .	- 200 غ
مستخلص قلب البقر .	- 250 غ
بروتيوز Proteose .	- 10 غ
دكستروز (غلوكوز) .	- 2 غ
كلور الصوديوم .	- 5 غ
آغار .	- 15 غ
ماء مقطر .	- 1000 مل

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تنتفح حبات الآغار، وتتحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.4 ويوزع في أنابيب ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م .
هذا الوسط غني جداً ويصلح لنمو معظم الجراثيم وإن كانت بحاجة إلى عوامل نمو ، مثل العقديات وغيرها .

وسط هيكتون آغار Hektoen agar :

المكونات :

بيتون .	- 12 غ
أملاح الصفراء .	- 9 غ
مستخلص الخميرة .	- 3 غ

لاكتوز .	12 غ
سالسيلين .	12 غ
سكرور .	12 غ
كلور الصوديوم .	5 غ
كبريتات الصوديوم .	5 غ
سترات أمونيوم الحديد Ferrus ammonium citrate .	1.5 غ
فوكسين قاعدي Acid fuchsin .	0.1 غ
آغار .	14 غ
أزرق بروميتيمول Bromothymol blue .	0.065 غ

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تنفتح حبات الآغار، وتتحل تماماً ، ثم تبرد حتى الدرجة 50° م ، وتصب مباشرة في أطباق بتري معقمة دون تعقيم.

وسط آغار المانيتول الملحي (شابمان) Mannitol salt agar :

المكونات :

مستخلص اللحم .	1 غ
بيتون .	10 غ
مانيتول .	10 غ
كلور الصوديوم .	75 غ
أحمر الفينول Phenol red .	0.025 مل

- 15 غ آغار .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير :

تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار، وتتحل تماماً، تضبط درجة pH على 7.4 ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م . يستخدم 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 مغلياً لمدة دقيقة واحدة أو أكثر حتى تتفتح حبات الآغار، وتتحل تماماً ، تضبط درجة pH على 7.2 ويوزع في أنابيب ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م ، ثم يترك ليتصلب بالوضع القائم .

ملاحظة: يمكن إضافة ملح النترازيليوم للوسط الذي يلون الخلايا باللون الأحمر فتظهر الحركة أكثر وضوحاً.

وسط اختزال النترات Nitrate reduction medium :

المكونات :

- 3 غ مستخلص اللحم .
- 5 غ ببتون .
- 1 غ نترات البوتاسيوم .
- 1000 مل ماء مقطر .

طريقة التحضير : تمزج المكونات، تضبط درجة pH على 7 ويوزع في أنابيب ، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة 121°م .

ثالثاً: أوساط خاصة بالجراثيم اللاهوائية

وسط التيوغليكولات Thioglycolate medium :

المكونات :

- 15 غ كازئين .
- 5 غ سيستئين .
- 5 غ غلوكوز .
- 5 غ مستخلص الخميرة .
- 2.5 غ كلور الصوديوم .
- 0.5 غ تيو غليكولات الصوديوم .
- 0.7 غ آغار .

طريقة التحضير : تمزج المكونات ويوضع المزيج في حمام مائي ، تضبط درجة pH على 7.1 ويوزع في أنابيب، ويعقم لمدة 20 دقيقة عند الدرجة

121°م ، وعند الاستعمال يوضع في حمام مائي مغلياً لمدة 20 دقيقة ثم يترك ليبرد قبل تلقّحه بالجرثوم .

وسط المرق بالغلوكوز V . L :

المكونات :

ببتون .	- 10 غ
كلور الصوديوم .	- 5 غ
مستخلص اللحم .	- 2 غ
مستخلص الخميرة .	- 5 غ
كلوريدات السيستئين .	- 0.3 غ
ماء مقطر .	- 1000 مل

طريقة التحضير :

تمزج المكونات وتضبط درجة pH على 7.4 - 7.5 ثم نضيف الغلوكوز بنسبة 2 - 10 غ بالليتر حسب الحالة . توزع في أنابيب بمعدل 12 مل لكل أنبوب وتعقم بالصاد الموصد مدة 15 دقيقة عند الدرجة 115°م، وعند الاستعمال يوضع في حمام مائي مغلياً لمدة 20 دقيقة ثم يترك ليبرد قبل تلقّحه بالجرثوم .

ويمكن إضافة الآغار إليه بنسبة 20 غ لكل ليتر فيصبح الوسط صلباً ويستعمل في أنابيب أو أطباق بتري .

دليل الصبغات والكواشف

محاليل صبغة غرام : Gram staining

أ - صبغة الكريستال البنفسجي : Crystal violet

- 1 غ بلورات بنفسجية بنقاوة 90 % من الصبغة .
- 100 مل من الماء المقطر .
- تذاب الصبغة ثم ترشح .

طريقة أخرى :

- 2 غ بلورات بنفسجية .
- 20 مل كحول إيثيلي 95 % .
- 80 مل من محلول أوكزالات الأمونيوم 1 % .
- تذاب ثم ترشح .

طريقة أخرى :

- 1 غ بلورات بنفسجية .
- 10 مل كحول 100 % .
- 1 غ حمض فيني .
- 100 مل ماء مقطر .

تحل 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، وتعديل الحموضة حين حصولها بإضافة قليل من ثاني فحمات الصوديوم .

ج - محلول السفرائين Safranine :

- 0.25 غ سفرائين نقاوة 90 % .
 - 10 مل كحول ايتيلي 95 % .
 - 1000 مل ماء مقطر .
- يذاب السفرائين في الكحول ثم يضاف 10 مل ماء مقطر ويرشح المزيج .

صبغة أزرق الميتلين Methylene blue :

- 3 غ أزرق الميتلين .
 - 30 مل كحول 95 % .
 - 100 مل ماء مقطر .
- يذاب أزرق الميتلين بالكحول، ثم يضاف إليه الماء، ويرشح.

الصبغة المقاومة للأحماض (زيل-نلسون) Ziehl - Neelsen :

أ - محلول كربول الفوكسين Carbol Fuchsin :

- 0.3 غ فوكسين قاعدي .
- 10 مل كحول ايتيلي 95 % .
- 100 مل محلول مائي للفينول بتركيز 5 % (أي إضافة 5 غ فينول إلى 95 مل ماء مقطر) .
- تخلط المواد السابقة وترشح .

ب - الكحول الحامضي Acid alcohol :

- 970 مل كحول ايتيلي 95 % .
- 30 مل حمض كلور الماء 37 % .

ج - أزرق الميتلين الفيني :

- 2 غ أزرق الميتلين .
- 10 مل كحول 100 % .
- 2 غ حمض فيني مثلج (فينول) .
- 100 مل ماء مقطر .
- يحضر بنفس طريقة الكريستال البنفسجي الفيني .

صبغة ليفسون لتلوين السياط :

- 20 مل $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ محلول مشبع .
- 10 مل محلول حمض العفص بالماء بتركيز 20 % Tannic acid .
- 10 مل ماء مقطر .

- 15 مل كحول إيثيلي 95 % .
- 3 مل فوكسين قاعدي (0.3 غ فوكسين محلول في 10 مل كحول 95 % يؤخذ منه 3 مل) .
- تضاف هذه المواد بالترتيب نفسه، وتحضر قبل الاستعمال مباشرة حيث تصلح لمدة أسبوع واحد فقط إذا حفظت في زجاجة محكمة الإغلاق، وفي الثلاجة .

صبغة وورث ومعاونيه لتلوين الأبواغ الجرثومية :

Wirthe – schaeffer – fulton

أ - محلول أخضر المالاكيت : Malachite green

- 5 غ أخضر المالاكيت .

- 100 مل ماء مقطر .

تذاب الصبغة وترشح .

ب - محلول السفرانين : Safranine

- 0.5 غ سفرانين .

- 100 مل ماء مقطر .

تذاب الصبغة وترشح .

محاليل طريقة فونتانا : Fontana

أ - حمض العفص : Tannic acid

- 5 غ حمض العفص .

- 10 مل فينول بتركيز 1 % .

- يذاب الحمض في الفينول .
ب - محلول نترات الفضة : بتركيز 5 % .

محاليل طريقة فونتانا - تريبونديو Fontana - Tribondeau :

أ - محلول روج Ruge:

- 2 مل فورمول .
 - 1 مل حمض خل ثلجي .
 - 100 مل ماء مقطر .
- تمزج المواد وتحفظ في زجاجة ملونة بالظلام .

ب - حمض العفص :

- 4 غ حمض عفص .
 - 100 مل ماء مقطر .
- تحل بحرارة خفيفة وإذا تعكر المحلول يرشح، ويوضع في زجاجة قاتمة .

ج - محلول نترات الفضة الأمونياكي :

نضع 100 مل من محلول نترات الفضة 5 % المحضر حديثاً، نضيف إليه بالتدريج قطرة فقطرة من محلول النشادر الكثيف والممدد بنسبة 3/1 بالماء .
نحرك المزيج بقضيب زجاجي حتى يذوب الراسب البني المتشكل بسبب إضافة النشادر، حتى نصل حالاً لا ينحل فيها الراسب. نتابع إضافة القطرات حتى نحصل على محلول عكر بصورة خفيفة ، فإن وجود العكر ضروري ، وفي حال كون السائل رائقاً يضاف له بضع قطرات من محلول نترات الفضة .

صبغة غيمزا Giemsa :

- 3.8 غ صبغة غيمزا .

- 200 مل غليسرول .

- 312 مل غول ميتيلي .

يسخن كل من الغول الميتيلي والغليسرول على حدة في حمام مائي حتى الدرجة 60°م ، يذاب الصبغ في الغول، ويضاف إليه الغليسرول ببطء، ويمزج جيداً، ويترك مدة ليلة واحدة، ثم يرشح . عند الاستعمال يمدد بالماء المقطر المعتدل بنسبة قطرة واحدة من الملون لكل 1 مل من الماء المقطر المعتدل (نحضر الماء المقطر المعتدل بإضافة حجم من الماء العادي إلى حجمين من الماء المقطر) .

مشعر أزرق بروم تيمول :

يحل 0.4 غ من أزرق البروم تيمول في 500 مل من الكحول الايتيلي 95 % ثم يضاف إليه 500 مل من الماء المقطر ، ثم نرشح المزيج .

مشعر بروم كريزول الأرجواني :

يحضر بنفس طريقة المشعر السابق.

مشعر أخضر بروم كريزول :

يحضر بنفس طريقة المشعر السابق.

مشعر أحمر الميتيل :

يحضر بنفس طريقة المشعر السابق, ولكن باستخدام 0.2 غ من أحمر الميتيل .

مشعر أحمر الكريزول:

يحضر بنفس طريقة المشعر السابق, ولكن باستخدام 0.2 غ من أحمر الكريزول.

مشعر الفينول فتالين:

يحل 1 غ من الفينول فتالين في 50 مل من الكحول الايتيلي 95 % ثم يضاف 50 مل من الماء المقطر.

كاشف إيرلخ - كوفاكس Ehrlich - Kovacs :

هو بارا دي ميتيل أمينو بنز ألدهيد Paradimethylaminobenzaldehyde يحضر بمزج 5 غ بارا دي ميتيل أمينو بنز ألدهيد مع 75 مل من الغول الاميلي Alcohol amylique على البارد ثم يضاف 25 مل من حمض كلور الماء النقي.

كاشف شب الحديدي للكشف عن الفينيل بيروفيك :

يحضر بحل 5 مل من محلول نصف مشبع من شب الحديدي مع 2 غ من كبريتات الأمونيوم و 1 مل من حمض الكبريت 10 % .

كاشف أنزيم السيتوكروم أوكسيداز :

يتألف من محلولين يوضعان بالتتابع على المستعمرة الجرثومية وهما :

محلول 1 % ألفا نفتول في الغول الايتيلي (2 قطرة) .

محلول 1 % من حمضات بارا دي ميتيل أنيلين (2 قطرة) .

المصطلحات Terms

A

Actinobacteria	الجراثيم الشعاعية
Actinomycetes	الشعاعيات
Aerobicbacteria	الجراثيم الهوائية
Agar	الاجار
Agarslope	الآجار المائل
Agglutination	التراص
Anaerobicbacteria	الجراثيم اللاهوائية
Alcohol- Fermentation	تخمير كحولي
Ammonia	أمونيا أو نشادر
Ammonification	نشرة
Amylas	أنزيم الاميلاز
Antigens	مولدات الضد
Antibodies	الأجسام المضادة
Antibiotic	صاد حيوي

Atomic Force Microscope

مجهر القوة الذرية

Autoclave

الاتوغلاف (الصاد الموصد)

B

Bacillus

عُصية

Bacterial Transformation

التحول أو التحويل الجرثومي

Bacteriostatic

مثبط للجراثيم

Bacterial Counter

عدادة جرثومية

Bactericidal

قاتل للجراثيم

Bacterialmutation

طفرة جرثومية

Bacterial variations

التغيرات الجرثومية

Bacteria

جراثيم

Bacterial

جرثومي

Biocorrosion

التآكل الحيوي

Biofouling

التعفن الحيوي

Biofilms

الرقائق أو الأفلام الحيوية

Biological

حيوي

Biology

علم الأحياء (بيولوجيا)

Biotechnological

Blue Bromothymol	التقانة الحيوية زرقة البروموثيمول
Blank	شاهد
Broth	مرق
C	
Confocal Microscope	المجهر المتحد البؤر (المُبائِر)
Conjugation Bacterial	الاقتران الجرثومي
Cell	خلية
Centrifugation	تثقيب
Carbohydrates	سكريات
Cocci	عصيات مكورة
Coliforms	أشكال معوية أو قولونية
Cocci	المكورات
Colony	مستعمرة
Capsule	المحفظة
D	
Diplococci	مكورات دقيقة

Disinfection

التطهير

E

Electrophoresis

رحلان كهربائي

Enterobacteriaceae

فصيلة الامعائيات

F

Fluorescence

الفلورة

Flagella

السياط

Feedback inhibition

التثبيط العكسي

Facultatively anaerobic
bacteria

الجراثيم اللاهوائية إختيارياً

Fluorescence Microscope

المجهر الفلورسيني

Filtration

ترشيح

Fimbriae

أهداب

G

Gram Staining

صبغة غرام

Genotype

نمط وراثي أو جيني

Gelatinase

أنزيم الجيلاتينات

Gene

المورثة، الجينية

Genetics	علم الوراثة
Generation	جيل
Gelatinous	هلامي
Genome	جينوم
Glycogen	جليكوجين
Glycoproteines	بروتينات سكرية
Gram – negative	سالبة لصبغة غرام
Gram – positive	موجبة لصبغة غرام
Growth factors	عوامل النمو

H

Homofermentative	التخمير المتجانس (البسيط)
Heterofermentative	التخمير غير المتجانس
Heterotrophic	غيري الاغذاء (غير ذاتي التغذية)
Hypha	خييط فطري
Humus	دبال

I

Incubation	حضانة
------------	-------

Induced محرض

Induction تحريض

In –Vitro في الزجاج

In – vivo في الأحياء

Incubator حاضنة

L ضوء

Lipids شحوم

Lipoproteins بروتينات شحمية

Lysis تحلل الخلايا

M طبي

Media أوساط

Medical microbiology ميكرو بيولوجيا طبية

Membrane غشاء

Metabolism استقلاب

Microbes	أحياء دقيقة
Microbial	الميكروبات / ميكروبي
Microbiology	علم الأحياء الدقيقة
Micrococci	مكورات دقيقة
Microflora	ميكروفلورا
Microscope	مجهر
Milliporfilter	أغشية ترشيح دقيقة
Microaerophilic bacteria	الجراثيم المحبة لآثار من الأكسجين
Mutation	طفرة
N	
Negative Staining	التلوين السلبي
Nitrataion	نترتة
Nitrification	نترجة
Nucleic acid	حمض نووي
Nutrient	مغذ
O	
Obligate thermophytes	محبة للحرارة إجبارياً

Organic	عضوي
Organism	حي / كائن حي
Oxidation	أكسدة

P

Peritrichous	محيطي السياط
Pesticide	مبيد الآفة
pH	دالة الهروجين
Phenotype	النمط الشكلي
Phosphate	فوسفات
Plasmids	البلاسميدات
Progeny	خلايا النسل
Pili	أهداب أو زوائد شعرية
Pipette Pasteur	ممص باستور
Polysaccharides	عديدات السكر
Polypeptides	عديد الببتيد
Proteolysis	تحلل بروتيني

Pure

نقي

R

Restriction Enzymes

أنزيمات الاقتطاع

Recombination

التأشيب

Reaction

تفاعل

Recombinant

مؤشب

Recombination

تأشيب

Release

انطلاق

Resistance

مقاومة

Respiration

تنفس

Rhizosphere

محيط جذري

Rods (Bacilli)

عصيات

S

Sulfur

كبريت

Salmonella

سلمونيا

Sarcina

مكورات رزمية

Scanning Tunneling
Microscope

مجهر المسح النفقي

Shigella	شيغلا
Simple Staining	التلوين البسيط
Soil Microbiology	ميكرو بيولوجيا التربة
Solution	المحلول
Spirals	الملويات / اللولبيات / حلزوني
Starch agar	آغار النشاء
Staphylococci	مكورات عنقودية
Sterilization	التعقيم
Strain	سلالة
Streptococci	مكورات عقدية
Streptobacilli	عصييات عقدية
Substrate	ركيزة (مداد)
Sugars	سكريات
Sulphate	كبريتات
Tanins	مواد عفصية

T

Temperature	درجة الحرارة
Tetracocci	مكورات رباعية
Thermal	حراري
Theromphiles	محب للحرارة
Transcription	استنساخ
Transduction	تنبيع (النقل الوسيطي)
Transfer	انتقال
Translation	ترجمة
Treponema	اللولبيات
Typhoid	التيفية
Ultrasonic	فوق الصوتية
Ultraviolet	فوق البنفسجية
Urea	البولة
Vibrio	الضمات
Viruses	الفيروسات

Vitamins

فيتامينات

W

ديدان

Worms

مياه عادمة

Wastewater

X

أجسام غريبة

X-bodies

Y

خمائر

Yeasts

يرسينيا

Yersinia

Z

بيضة ملقحة

Zygote

المراجع

- 1- بغداددي, وفاء, ميهوب, حامد, حمد, ابتسام (1988) بيولوجيا المشرقيات, جامعة دمشق, مطبعة الاتحاد.
- حمد, ابتسام, (2006) علم الجراثيم العام, كلية العلوم, منشورات جامعة دمشق.
- 2- عبيد, ميخائيل, (1997) علم الجراثيم الجزء النظري, الطبعة الثانية, منشورات جامعة دمشق.
- 3- عبيد, ميخائيل, (2000) علم الجراثيم الجزء العملي, الطبعة الرابعة, منشورات جامعة دمشق.
- 4- السلامة, علي عبد الله, علي, زيد, علي, محمد, (2002) التجارب العلمية في البكتريا الطبية, منشورات جامعة الملك سعود.
- 6-Harry W.Seeley,Jr, Paulj, Vandemark (1989), Microbes in Action, Alaboratory Manual of Microbiology, thix Edition, Cornell university Publisher.
- 7-Prescott, Harley and Klein s , (2008), Microbiology Seveth Edition, the Mc Graw- Hill companies Publisher.

- 8-Abigail, A.S, Dixie. D.W. (2001), Microbiology Diversity, Disease, and the Environment Fitzgerald Science Press Publisher.
- 9-Harley, J.P,(2005) Laboratory Exercises In Microbiology, Sixth Edition, Kentucky University, the Mc Graw- Hill Higher Education Publisher.
- 10-Baron, E.J, Peterson, L.R, Fine Gold, S.M, (1994), Diagnostic Microbiology. Ninth Edition Copyright by Mosby – Year Book, Inc Publishers.
- 11-Prescott, L.M, Harley, J.P, Klein, D.A, (1996) Microbiology, Third Edition, W.M.C.Brown Publishers, Turnhout, Canada.
- 12- Forbes, B.A, Sahm, D.F, Weissfeld, A.S. (2002). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th edition. Mosby, Inc. Philadelphia, PA, USA.
- 13- Talaro, K.P, Talaro, A. (2002). Foundation in Microbiology. 4th .ed. McGraw- Hill. U.S.A. ISBN: 0-07-248864-6.
- 14- Betsy, T.D.C, Keogh, J. (2005). Microbiology Demystified. McGraw- Hill. U.S.A. ISBN: 0-07 147134-0.

- 15- Prescott, L.M. (2002). Micorbiology.5th . Ed. McGraw-Hill. U.S.A. ISBN: 0-07- 282905-2.
- 16- Burton, G.R.W, Engelkirk, P.G (2002). Micorbiology for the Health Sciences.7th . Ed. Lippincott Williams and Wilkins co. U.S.A.
- 17- 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.

اللجنة العلمية:

- الأستاذة الدكتورة ابتسام حمد
- الأستاذ الدكتور عدنان علي نظام
- الأستاذ الدكتور عبد الله العيسى

المدقق اللغوي: الدكتور عبد الكريم حسين

حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات
الجامعية