أساسيات الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

منشورات جامعة البعث
كلية الزراعة

أســـاســـيات
علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الدكتور عبد الله العيسى — **المهندسة ميساء علوش**
أستاذ في كلية الزراعة — **قائمة بالأعمال**

مديرية الكتب والمطبوعات لجامعية
١٤٢٦ هـ – ٢٠٠٦ م

المدققون العلميون:

أ.د. عيسى كبيبو

أ.د. عبد الله العيسى

د. حسان كور

المدقق اللغوي:

أ.د. سمير معلوف

بعد أن نفدت نسخ الطبعة الأولى من هذا الكتاب الذي أُلّف لأول مرة في عام ١٩٩٨، كان لا بد من إجراء بعض التعديلات عليه، والتي شملت إدخال موضوعات جديدة كالتخمرات ، والفيروسات البكتيرية، والتفصيل في تصنيف الفطريات وبعض طرائق فحصها. وكيفية الكشف عن الكائنات الحية الدقيقة المحيطة بجذور النباتات (الريزوسفير) وطرائق عزل وتنمية البكتريا اللاهوائية وغيرها الكثير من الموضوعات. وبشكل عام يحوي هذا الكتاب مبادئ أساسية في عملي الأحياء الدقيقة حيث عالج الفصل الأول أنواع المجاهر. وتم التطرق في الفصل الثاني إلى طرائق التعقيم. أما الفصل الثالث (الأوساط المغذية) فكان مقدمة لابد منها لما سيأتي عليه ذكره في الفصل الرابع من بيانٍ للطرائق المختلفة في عزل الأحياء الدقيقة. لننتقل في الفصل الخامس والسادس إلى شرحٍ عن كيفية تجهيز المحضرات لدراسة أشكال وتراكيب الخلايا البكتيرية. أما الفصل السابع فخصّص لدراسة أهم الشعب الفطرية حسب التصنيف الحديث للفطريات. ويُمَكّن الفصل الثامن الطالبَ من التعرف على طرائق تحديد التعداد العام للكائنات الحية الدقيقة في الأوساط المختلفة . أما الفصل التاسع فيعدّ مدخلاً لتحديد نوع الكائن الحي الدقيق عن طريق دراسة خواصه المجهرية و المزرعية والبيوكيميائية. وبيّن الفصل العاشر الدور العظيم الذي تلعبه ميكروبات التربة في دورة العناصر في الطبيعة (الآزوت، الكربون، الكبريت، الفوسفور) أما الفصل الحادي عشر فخصص لإجراء الاختبارات الميكروبيولوجية للمياه والحليب والحبوب. في حين تم في الفصل الثاني عشر إجراء التجارب الرئيسة لبعض التخمرات كالتخمر الكحولي واللبني والبيوتريكي .

أعدت القائمة بالأعمال السيدة ميساء علوش الفصل الأول والثاني والسابع في حين قام الأستاذ الدكتور عبد الله العيسى بإعداد باقي فصول الكتاب.

غرة شعبان ١٤٢٦ الموافق لأيلول ٢٠٠٥

المؤلفان

التعليمات الواجب مراعاتها في مخبر الأحياء الدقيقة **١٣**

.....

الفصل الأول : المجهر **١٥**

.....

١- المجهر الضوئي ١٥

٢- المجهر الضوئي ذو الحقل المظلم ٢٣

٣- المجهر المتباين الأطوار ٢٥

٤- مجهر الأشعة فوق البنفسجية ٢٩

٥- المجهر الإلكتروني ٢٩

الفصل الثاني : التعقيم **٣١**

.....

أولاً : التعقيم الفيزيائي ٣١

١- التعقيم بالحرارة ٣١

٢- التعقيم بالأشعة ٤١

٣- التعقيم بالترشيح ٤٢

٤- التعقيم بالأمواج فوق الصوتية ٤٥

ثانياً: التعقيم الكيميائي ٤٦

ثالثاً: التعقيم الحيوي ٤٨

الفصل الثالث : الأوساط المغذّية **٤٩**

.....

أنواع الأوساط المغذية ٤٩

١- حسب قوامها: ٤٩

١-١- الأوساط السائلة ٤٩

١-٢- الأوساط الصلبة ٥٠

١-٣- الأوساط نصف الصلبة ٥١

٢- حسب تركيبها: ٥١

٢-١- أوساط تركيبيّة ٥١
٢-٢- أوساط غير تركيبيّة ٥١
٢-٣- أوساط شبه تركيبيّة ٥٢
٣- حسب الهدف من استخدامها: ٥٢
٣-١- أوساط انتخابية ٥٢
٣-٢- أوساط تفريقية ٥٢
مراحل تجهيز الوسط المغذي ٥٣
أمثلة عن بعض الأوساط المغذية وطريقة تحضيرها ٥٥
طريقة تجهيز الآجار المائل ٥٦
طريقة تجهيز الآجار العميق ٥٧
الفصل الرابع : تنمية وعزل الأحياء الدقيقة ٥٩
مقدمة وتعاريف ٥٩
طرائق زرع الكائنات الحية الدقيقة ٦١
طرائق عزل البكتريا ٦٦
آ- طريقة الأطباق المخطوطة ٦٦
ب- طريقة الأطباق المصبوبة ٦٧
جـ- طريقة الأطباق المنشورة ٦٩
ء- عزل خلايا منفردة باستخدام تقنية Micromanipulater Technique ٦٩
هـ- عزل البكتريا المتبوغة ٧٠
و- تنمية وعزل البكتريا اللاهوائية ٧٠
الفصل الخامس: طرائق تجهيز المحضرات للفحص بالمجهر الضوئي (الصبغ البسيط) ٧٧
أولاً : طرائق تجهيز محضرات الخلايا الحية: ٧٧
١- طريقة القطرة الرطبة ٧٧
٢- طريقة القطرة المعلّقة ٧٨
حركة البكتريا ٨٠
ثانياً : تجهيز محضرات الخلايا المثبتة والملونة : ٨١
الفحص المجهري للبكتريا (الصبغ البسيط) : ٨٥

الفحص المجهري للبكتيريا المكورة ٨٦
الفحص المجهري للبكتيريا العصوية ٨٨
الفحص المجهري للبكتيريا الضمية والحلزونية ٨٨
الفحص المجهري للبكتيريا اللولبية ٨٩
الفحص المجهري للبكتيريا الخيطيّة (الأكتينومايسيتس) ٩٠
الفحص المجهري لـ *Nocardia* ٩٢
الفحص المجهري لـ *Mycobacterium* ٩٣
الفحص المجهري للريكتيسيا ٩٤
الفحص المجهري للميكوبلازما ٩٦
تقدير أبعاد الكائنات الحية الدقيقة بواسطة المجهر الضوئي ٩٦
الفصل السادس: دراسة بنية الخلية البكتيرية (الصبغ المركب) **٩٩**

١- صبغ البكتيريا بطريقة غرام ٩٩
٢- صبغ البكتيريا المقاومة للأحماض ١٠٣
٣- صبغ الأبواغ البكتيرية ١٠٥
٤- صبغ المحفظة (الكابسولة) ١٠٩
٥- صبغ السياط البكتيرية ١١٠
٦- صبغ المادة النووية ١١٣
٧- صبغ المدخرات السيتوبلاسمية ١١٤
آ- صبغ الفوليوتين ١١٤
ب- صبغ الغليكوجين ١١٥
جـ- صبغ الغرانولاز ١١٦
ء- صبغ حمض بولي بيتا هيدروكسي بيوتريك ١١٧
الفصل السابع : الفطريات 119
عزل الفطريات ١١٩
طرائق تجهيز المحضرات المجهرية الفطرية ١٢٢
تصنيف الفطريات: ١٢٦
الفطريات التابعة لمملكة الـ Protista ١٢٦
الفطريات التابعة لمملكة الـ Stramenopila ١٢٧
الفطريات التابعة لمملكة الفطريات Fungi ١٢٨
الخمائر ١٤٠
الفيروسات البكتيرية (البكتيروفاج) ١٤٢
الفصل الثامن : طرائق تحديد تعداد الكائنات الحية الدقيقة ١٤٧
أولاً- طريقة العدّ المباشر تحت عدسة المجهر ١٤٧
ثانياً- طريقة العدّ المباشر تحت عدسة المجهر باستخدام أقراص الترشيح ١٤٩
ثالثاً- عد الأحياء الدقيقة بطريقة الأطباق ١٥١
رابعاً- تقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة عن طريق تحديد درجة العكارة (التعكير) ١٥٦
خامساً- تقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة بطريقة العدد الأكثر احتمالاً (العدد الأرجح) ١٥٩

سادساً- تحديد تعداد الكائنات الحية الدقيقة في الهواء ١٦٦

الفصل التاسع : مدخل إلى تحديد نوع الأحياء الدقيقة ١٧١

.....

أولاً : الخواص المزرعية ١٧١

ثانياً : الخواص الشكلية (المجهرية) ١٧٤

ثالثاً : الخواص الفيزيوبيوكيميائية: ١٧٥

١- القدرة على استخدام المواد الكربوهيدراتية والكحولات ١٧٥

٢- حلمهة النشاء ١٧٦

٣- تمييع الجيلاتين ١٧٨

٤- تشكل الأمونيا ١٧٩

٥- تشكل الأندول ١٧٩

٦- تشكل كبريت الهيدروجين ١٨٠

٧- إرجاع النترات ١٨١

٨- النمو على وسطٍ خالٍ من الآزوت ١٨٢

٩- النمو على وسطٍ تركيبي خالٍ من عوامل النمو ١٨٣

١٠- التأثير في الحليب ١٨٣

١١- اختبار الكتلاز ١٨٤

١٢- اختبار أحمر المثيل ١٨٥

١٣- اختبار فوجيس بروسكاير ١٨٦

١٤- اختبار السترات ١٨٦

١٥- تأثير رقم حموضة الوسط ١٨٧

١٦- تأثير الأوكسجين ١٨٧

١٧- تأثير درجة الحرارة ١٨٧

١٨- تأثير كلوريد الصوديوم ١٨٨

١٩- تأثير بعض العوامل الأخرى ١٨٩

التضاد الحيوي بين الأحياء الدقيقة ١٩٤

اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بطريقة أقراص كيربي – باور ١٩٦

الفصل العاشر : الوجيز في ميكروبيولوجيا التربة ١٩٩

أولاً – دراسة المجاميع الأساسية للأحياء الدقيقة في التربة (البكتريا–الأكتينومايسيتس–الفطريات–الطحالب) ١٩٩
١- أخذ عينة التربة وطريقة تحضيرها ١٩٩
٢- تحضير معلّق التربة ٢٠٠
٣- إجراء عملية الزرع ٢٠٢
٤- حساب عدد الكائنات الحية في ١غ تربة جافة تماماً ٢٠٣
البكتريا ٢٠٤
الأكتينومايسيتس ٢٠٦
الفطريات المجهرية ٢٠٧
الطحالب ٢٠٩
التعرّف على الأحياء الدقيقة للتربة بطريقة الشريحة الملامسة ٢١٠
ثانياً– دراسة بعض العمليات الحيوية للكائنات الحية الدقيقة في التربة ٢١٢
النشدرة ٢١٢
النترجة (التأزت) ٢١٥
انطلاق الآزوت (عكس التأزت) ٢١٨
تثبيت الآزوت ٢٢١
تحلل السيللوز ٢٢٨
تحوّل مركبات الكبريت ٢٣٤
تحوّل مركبات الفوسفور ٢٣٨
دراسة الأحياء الدقيقة في منطقة نمو المجموع الجذري (الريزوسفير) وعلى سطوح جذور النباتات ٢٤١

الفصل الحادي عشر : الاختبارت الميكروبيولوجية للمياه والحليب والحبوب ... **٢٤٥**
الفحص الميكروبيولوجي للمياه **٢٤٥**
أولاً: تحديد التعداد العام للأحياء الدقيقة (الاختبار الكمي) ٢٤٧
ثانياً: الكشف عن البكتيريا الدالة على التلوث: مجموعة الكوليفورم (الاختبار النوعي) ٢٥٠

آ- الاختبار الاحتمالي ٢٥٠
ب- الاختبار التأكيدي ٢٥٦
جـ- الاختبار المتمم ٢٥٨
الفحص البكتيري للمياه باستعمال أغشية الترشيح ٢٦٠
الفحص الميكروبيولوجي للحليب **٢٦٥**
١- فحص الحليب بطريقة الأطباق المصبوبة ٢٦٥
٢- العدّ المباشر للبكتيريا تحت عدسة المجهر (طريقة بريد) ٢٦٦
٣- إجراء الاختبار الاحتمالي لمجموعة الكوليفورم في الحليب ٢٦٨
٤- اختبار إرجاع أزرق الميتلين ٢٦٨
الاختبارات الميكروبيولوجية للحبوب **٢٧٠**
أولاً : تقدير التعداد العام للبكتيريا الهوائية ٢٧١
ثانياً : تقدير تعداد البكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة ٢٧٢
ثالثاً : تقدير تعداد الفطريات ٢٧٢
رابعاً : تقدير بكتيريا حمض اللبن ٢٧٢
الفصل الثاني عشر : دراسة بعض التخمرات ٢٧٥
مقدمة ٢٧٥
التخمر الكحولي ٢٧٦
التخمر اللبني ٢٧٩
التخمر الزُبَديّ (البيوتريكي) ٢٨٤
المصطلحات العلمية ٢٨٧
المراجع باللغة العربية ٢٩٨
المراجع باللغات الأجنبية ٢٩٩

التعليمات الواجب مراعاتها
أثناء العمل في مخبر الأحياء الدقيقة

- يتم الدخول إلى المخبر بعد ارتداء المعطف القطني الأبيض النظيف و يحذّر من ارتداء المعاطف غير القطنية (المصنوعة من نسيج صناعي) نظراً لخطورتها في حال حدوث حريق.
- يجب قراءة فحوى الجلسة العملية مسبقاً.
- مراعاة الهدوء و الانضباط و الدقة في أثناء العمل.
- يجب أن تكون طاولة العمل خالية من الأدوات و المواد التي لا لزوم لها في العمل مثل الكتب و المعاطف و الحقائب و غيرها.
- تُنَظّف طاولة العمل بمادة مطهرة قبل البدء بالجلسة العملية و بعد الانتهاء منها.
- مراعاة شروط التعقيم في أثناء استخدام و تداول الأحياء الدقيقة.
- يجب عدم ترك أنابيب الاختبار أو الحوجلات أو أطباق بتري المحتوية على مزارع ميكروبية مفتوحة.
- ينبغي التخلص من المزارع الميكروبية القديمة عن طريق قتلها بالأوتوكلاف، و لا يجوز بحال من الأحوال التخلص من المزارع الميكروبية القديمة عن طريق رميها في الحاويات أو أحواض الغسل أو التربة....
- يُمنع نقل أيٍّ من محتويات الجلسة العملية إلى خارج المخبر كالمزارع الميكروبية أو العينات أو الأمصال قبل سؤال المشرف على الجلسة العملية.
- يجب عدم استخدام الأجهزة (و خصوصاً الأوتوكلاف) و الأدوات و المعدات إلا بعد الخبرة التامة في كيفية التشغيل.
- تجنب العمل في المخبر في حال وجود جروح في اليدين.

- الإبلاغ عن كل حادث يقع مع الطالب مثل: إصابته بخدش أو جرح، أو عند كسر إحدى الحوجلات، أو أطباق بتري، أو الأنابيب الحاوية على مزارع ميكروبية و ذلك ليتسنى للمشرف إجراء ما يلزم.
- عدم الخروج من المخبر قبل غسل اليدين جيداً بأحد المطهرات.

الفصل الأول
المجهـــر

لما كانت الكائنات الحية الدقيقة متناهية في الصغر، كان لابد لدراستها من وجود جهاز يسمح برؤيتها و قياس أبعادها و التعرف على أشكالها، و هذا ما يحققه المجهر، و هو الأداة الأساسية التي لا يستغنى عنها في مخبر الأحياء الدقيقة.

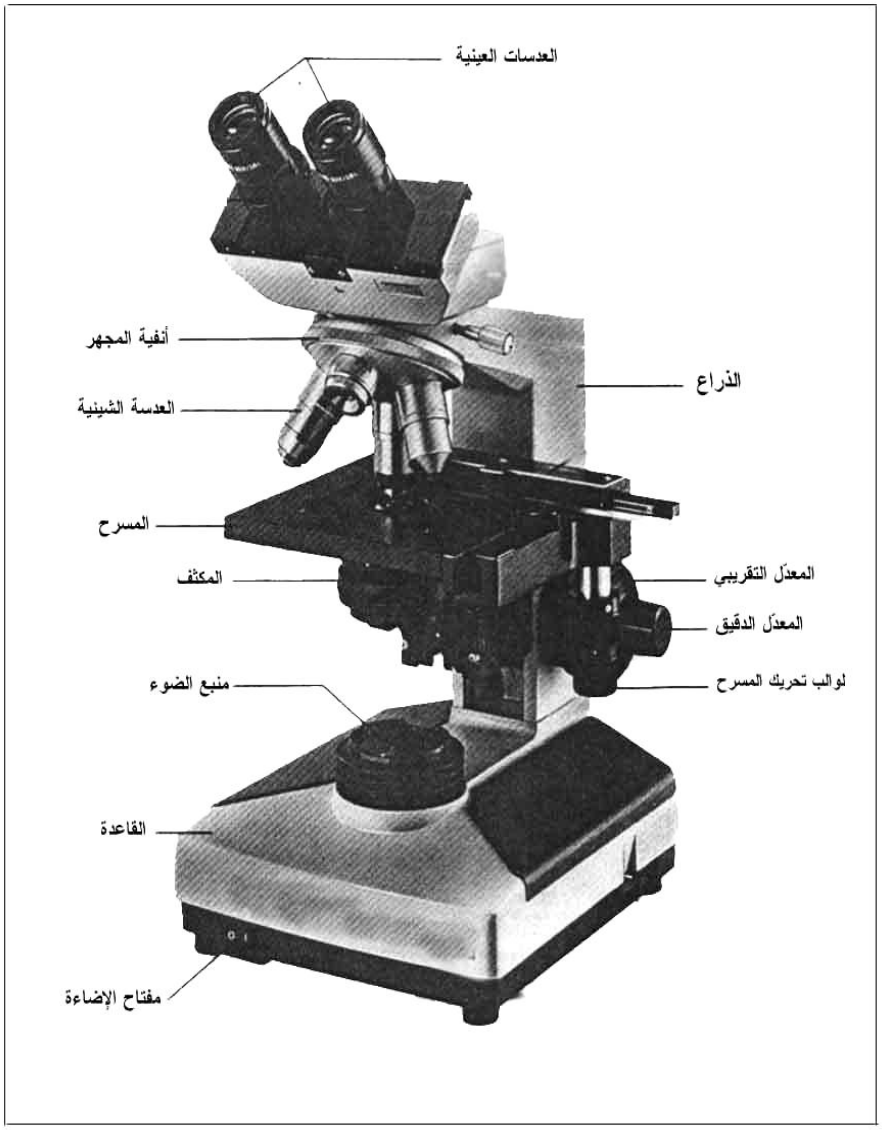
لقد ارتبط تطور علم الأحياء الدقيقة بتطور وسائل البحث و تطور المجاهر التي بلغت أنواعاً عدة تعتمد على تقنيات مختلفة أشهرها:

١- المجهر الضوئي ذو الحقل المضيء : Brightfield microscopy

يسمح هذا النوع من المجاهر بمرور أشعة الضوء من خلاله لتصل إلى عين الفاحص دون أن يتعرض الضوء إلى أي جسم معتم؛ أي أن حقل الرؤية يكون مضاءً إضاءة كاملة. و هو أول المجاهر المبتكرة و أكثرها استخداماً في مخابر الأحياء الدقيقة. و لا بد لفهم هذه المجاهر و طريقة التعامل معها من معرفة الأجزاء الأساسية المكونة لها (الشكل-١)

أ- الأجزاء الميكانيكية:

و تشمل القاعدة Base و الذراع Arm. يرتبط بهذين الجزأين باقي الأجزاء الميكانيكية للمجهر، حيث يوجد المسرح Stage الذي يتم عليه حمل و عرض الشرائح المجهرية، يزوّد المسرح في معظم المجاهر بملاقط لتثبيت الشريحة الزجاجية ولوالب لتحريك المحضّر نحو اليمين و اليسار و نحو الخلف و الأمام. كما يوجد على جانبي الذراع لولبان أحدهما كبير يعرف بالمعدِّل التقريبي Coarse adjustment knob (لولب الإحكام الكبير) و الآخر صغير يعرف بالمعدِّل الدقيق Fine adjustment (لولب الإحكام الصغير). يعمل هذان اللولبان على تقريب المحضر المجهري إلى العدسات الجسمية (الشيئية) لتصل إلى المستوى الذي تكون فيه الرؤية أوضح ما يمكن و ذلك بخفض و رفع أنبوبة المجهر أو المسرح.



(الشكل–١) الأجزاء الرئيسة للمجهر الضوئي

ب– الأجزاء البصرية:

تضم الأجزاء البصرية ثلاثة أنواع من العدسات: عدسات عينية Oculars و عدسات جسمية أو شيئية Objectives و عدسات المكثف Condenser.

تُحمل العدسات العينية على أنبوبة المجهر التي تكون واحدة في بعض أنواع المجاهر و أحياناً اثنتين و عادةً ما تكون قوة تكبير العدسة العينية ١٠× أو ١٥×.

أما العدسات الشيئية (الجسمية) فتكون محمولة على قرص متحرك يدعى أنفية المجهر Nosepiece يسمح بتحريك العدسات الشيئية لإحضار العدسة الملائمة للفحص أعلى المحضر المجهري المفحوص، تمتلك غالبية المجاهر الضوئية ثلاث عدسات شيئية ذات قوى تكبير ١٠× ، ٤٥× ، ١٠٠× و أحياناً هناك عدسة شيئية رابعة قوة تكبيرها ٤× أو ٦٠×.

النوع الثالث للعدسات هي العدسات المكثفة و تكون موجودة أسفل المسرح، وظيفتها تجميع الأشعة الضوئية الصادرة من المنبع الضوئي و منحها مساراً مستقيماً مباشراً باتجاه المحضر المجهري، و هذه العدسات يمكن تحريكها بواسطة لولب خاص أسفل المسرح، كما يمكن التحكم بكمية الضوء الصادرة عن عدسات المكثف بواسطة حجاب Diaphragm يوجد أسفل المسرح و هو قرص حلقي الشكل يتم التحكم بمقدار فتحته بواسطة ذراع دائري الحركة يعمل على زيادة الفتحة أو تصغيرها بحيث تزيد أو تقلل كمية الأشعة الضوئية المتجهة نحو المحضر المجهري.

عند دراسة المجهر الضوئي لابد من الوقوف على شرح بعض التعابير مثل:

المسافة الفعالة Working distance:

و هي المسافة الفاصلة بين مقدمة العدسة الشيئية و سطح المحضر المجهري، و تتناسب هذه المسافة عكساً مع قوة تكبير العدسة الشيئية حيث تبلغ ٧ ملم عند استخدام الشيئية ١٠× و ١.٥ ملم عند استخدام الشيئية ٤٥× و تصبح ١ ملم عند استخدام الشيئية ٦٠× أما عند استخدام العدسة الزيتية الغاطسة ذات قوة التكبير ١٠٠× فتصبح هذه المسافة صغيرة جداً ٠.١٤ ملم حيث تغطس العدسة الشيئية في قطرة الزيت التي تعلو سطح المحضر المجهري.

قوة التكبير Degree of magnification:

و يقصد بها عدد مرات تكبير الجزء المفحوص، وهي تساوي حاصل جداء قوة تكبير العدسة الشيئية المستخدمة في الفحص و قوة تكبير العدسة العينية.

مثال: إذا كانت قوة تكبير العدسة العينية ١٥× و كنا نستخدم العدسة الزيتية الغاطسة ذات قوة تكبير ١٠٠× فإن الجسم المفحوص نراه أكبر بمقدار ١٥٠٠ مرة مما هو عليه.

الفتحة العددية (الرقمية) Numerical Aperture (NA):

و هي قيمة ثابتة لكل عدسة شيئية، و تحسب من العلاقة التالية:

$$NA = n.\sin\theta$$

حيث: n: معامل انكسار الوسط بين الجسم المفحوص و العدسة الشيئية.

(في حالة الهواء n=1، و في حالة زيت الأرز n=1.5)

θ: نصف زاوية أكبر مخروط للأشعة يمكن دخوله إلى العدسة الشيئية، و تُعطى هذه القيمة من الشركة الصانعة.

و من العلاقة السابقة نجد أن قيمة الفتحة العددية للعدسة الشيئية محدودة فهي أقل من ١ في الشيئيات الجافة (التي لا نستخدم معها زيت الأرز) و تكون بحدود ١.٤–١.٢ في العدسات المغمورة بالزيت (وهي العدسة ذات تكبير ١٠٠× و التي يتوجب عند استخدامها وضع قطرة من زيت الأرز على سطح المحضر المجهري المفحوص لتغطس فيها العدسة الشيئية عند الفحص و من هنا سميت العدسة ١٠٠× بالعدسة الغاطسة).

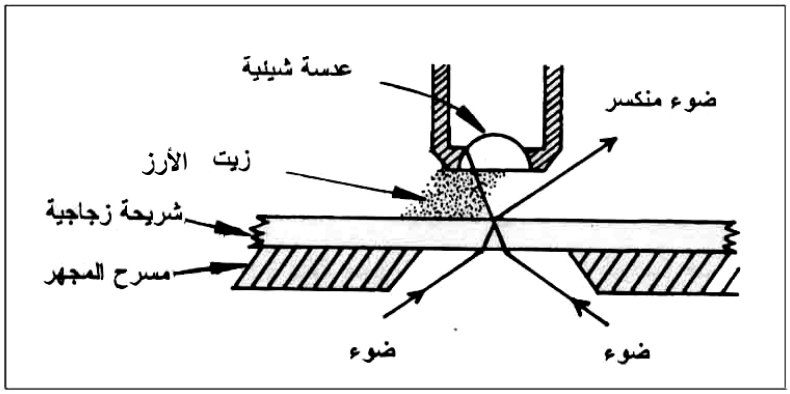
قوة التمييز (القدرة الإيضاحية) Resolving power:

و تعني قدرة العدسة الشيئية على التفريق بين نقطتين متجاورتين عندما تبدوان كشيئين منفصلين، و بمعنى آخر قدرة العدسة على إعطاء صورة منفصلة لا يتراكب بعضها فوق بعض و بذلك يمكن تحديد التفاصيل البنائية التي يمكن مشاهدتها تحت المجهر. و يتم تحديد القدرة التوضيحية من المعادلة التالية:

$$d = \frac{\lambda}{2.NA}$$

حيث: λ: طول الموجة للضوء المرئي المستعمل في الفحص. و هي تتراوح بين 0.7 – 0.4 ميكرومتر بالنسبة للمجاهر الضوئية.

و من العلاقة السابقة نستنتج أنه يمكن زيادة القدرة الإيضاحية (أي تقليل الرقم المعبّر عن القدرة الإيضاحية) باستخدام أشعة ضوئية أكثر قصراً أو بزيادة قرينة انكسار الوسط الذي ستمر خلاله الأشعة، و لهذا الغرض الأخير يُستخدم زيت الأرز لأن قرينة انكساره قريبة جداً من قرينة انكسار الزجاج $n=1.25$ و لهذا فإن الأشعة الضوئية الصادرة عن المكثف لن تغيّر مسارها كثيراً عند عبورها الزجاج (الشريحة التي تحمل المحضر المجهري) إلى الزيت فالعدسة الشيئية (الشكل–٢).



(الشكل–٢) تأثير زيت الأرز على مسار الضوء، يلاحظ أن الضوء في النصف الأيمن من الرسم يمر في خط مستقيم ليصل إلى العدسة، أما النصف الأيسر –حيث لا يوجد زيت– فإن الضوء ينكسر بعيداً عن العدسة. (طرابلسي، نقلاً عن أبو زنادة ومحمود، ١٩٨٥)

و كلما قلت القيمة المطلقة للقدرة التوضيحية أمكن رؤية الأشياء ذات الأبعاد الأصغر.

و من كل ما سبق يمكن فهم الفرق بين قوة التكبير و قوة التمييز حيث أن الأولى تعني إظهار المادة المدروسة مكبّرة و لا تزيد في التفاصيل الدقيقة للعينة، بينما قوة التمييز تعمل على تبيان التفاصيل الدقيقة للعينة المدروسة.

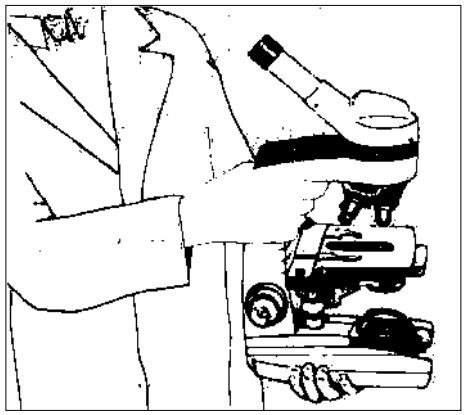
مثال:

إذا كانت الفتحة العددية للعدسة الشيئية الغاطسة NA = 1.25 و كان طول موجة الشعاع الضوئي المستخدم في الفحص λ = 0.5 ميكرومتر(ميكرون)، فإن القدرة التوضيحية للعدسة الشيئية = $\frac{0.5}{2\times1.25}$ = 0.2 ميكرومتر

أي أن العدسة الشيئية تستطيع أن تميّز الأجسام التي لا يقل قطرها عن ٠.٢ ميكرومتر. فإذا علمنا أن عين الفاحص لا ترى الأشياء التي تقل أبعادها عن 200 ميكرومتر، فلابد هنا أن تكون قوة التكبير ١٠٠٠ مرّة حتى يتسنى للفاحص رؤية الأشياء بوضوح و دقة.

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند التعامل مع المجهر:

- عدم تحريك المجهر من مكانه، و إذا كان لابد من تغيير مكان المجهر داخل المخبر فيجب حمله بكلتا اليدين؛ حيث يحمل المجهر من ذراعه باليد الأولى بينما تحمل اليد الثانية المجهر من أسفل قاعدته (الشكل–٣). و يمنع منعاً باتاً نقل مجهرين بذات الوقت.



(الشكل–٣) طريقة حمل المجهر داخل المخبر

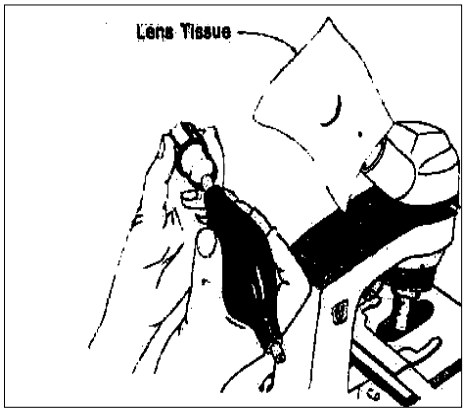
- ينبغي عدم قلب المجهر في أثناء حمله، لأن ذلك يؤدي إلى سقوط العدسة العينية.
- يوضع المجهر بعيداً عن ضوء الشمس، و يُحْفَظ من الصدمات و من الغبار.
- لا يُنْصح بإزالة العدسة العينية (أو العدسات) من أنبوبة المجهر حتى لا تتسخ أنبوبة المجهر و العدسات الشيئية بالغبار.

- لا تُتْرك الشريحة الزجاجية (المحضر) على المجهر بعد الاستعمال.
- يجب أن تبقى عدسات المجهر العينيّة نظيفة و يمنع لمسها بالأصابع و الأنف و بمواد التجميل التي توضع على العينين.
- يجب عدم إمالة المجهر في أثناء الفحص بالعدسة الزيتية الغاطسة، و ذلك حتى لا يسيل الزيت إلى الأسفل أو يتساقط داخل المكثف و يتصلب.
- ينبغي عدم ترك مصباح المجهر يعمل عند عدم الحاجة لذلك، كما يجب فصل المجهر كلياً عن الكهرباء عند الانتهاء من العمل.
- يتم تنظيف العدسات من الغبار و الصبغات و زيت الأرز بمنديل خاص بالعدسات Lens tissue مع استخدام مواد خاصة بهذا الغرض أهمها:

- مزيج من الكحول و الأسيتون: الذي يجب أن يستخدم بحذر لأن زيادة الكمية المستخدمة في التنظيف قد تؤدي إلى تخريب المادة اللاصقة للعدسات بفعل الأسيتون الموجود في محلول التنظيف.
- الكزيلين Xylene: و يعتبر أفضل المحاليل المستخدمة في التنظيف.

- يحتفظ بالمجهر مغطى أو في داخل الصندوق عند عدم استعماله.

ملاحظة: إذا وصل الغبار إلى الوجه الداخلي للعدسات العينية عندها تُزَال العدسة العينية من أنبوبة المجهر و تُنَظف من الداخل بواسطة منديل خاص يتم إدخاله في أنبوبة المجهر أو باستخدام محاقن خاصة تعمل على نفخ تيار من الهواء داخل أنبوبة المجهر فتطرد الغبار من داخل الأنبوبة. (الشكل- ٤)



(الشكل- ٤) ط

مراحل فحص المحضر المجهري:

١. اخفض مسرح المجهر إلى أدنى مستوى له بواسطة المعدِّل التقريبي (لولب الإحكام الكبير).
٢. ثبت الشريحة الزجاجية التي تحمل المحضّر المجهري على مسرح المجهر بواسطة ملاقط التثبيت الخاصة بذلك.
٣. حرّك أنفية المجهر لإحضار العدسة ذات التكبير المطلوب.
٤. قم بتشغيل مصدر الضوء في المجهر.
٥. حرّك المعدِّل التقريبي (لولب الإحكام الكبير) للحصول على أقرب مسافة فعّالة مع العدسة الجسمية (الشيئية) المستخدمة. و يجب في هذه المرحلة النظر من جانب الشريحة الزجاجية (حذار من النظر من خلال العدسة العينية و ذلك حتى لا يتهشم المحضر و تتخرب العدسة) و تذكر بأنه كلما كانت العدسة الشيئية ذات تكبير أقل كانت المسافة الفعالة أكبر والعكس صحيح.
٦. الآن فقط يمكن النظر من خلال العدسة العينية. حرّك المعدِّل الدقيق (لولب الإحكام الصغير) حتى تتضح معالم المحضر المجهري.
٧. قم بتحريك الشريحة المجهرية في كافة الاتجاهات و ذلك بواسطة اللوالب الخاصة بذلك، مع النظر من خلال العدسة العينية بحيث تمسح كامل المحضر المجهري، و تختار منه أفضل المواقع و تضعه في مركز الحقل المجهري.
٨. حرّك أنفية المجهر لإحضار العدسة الشيئية الأكثر تكبيراً من سابقتها (إن تطلب الأمر ذلك)، و بواسطة لولب الإحكام الدقيق يمكن إيضاح المحضر (حذار من استخدام لولب الإحكام الكبير في هذه المرحلة).
٩. إذا كان المحضر المجهري فطرياً، فإن العدسات ذوات تكبير 10×، 45× تكفي غالباً لدراسته. أما إذا كان المحضر بكتيرياً فيتم الفحص باستخدام العدسة الزيتية الغاطسة ١٠٠× و ذلك بوضع قطرة من زيت الأرز فوق المحضر قبل فحصه. و

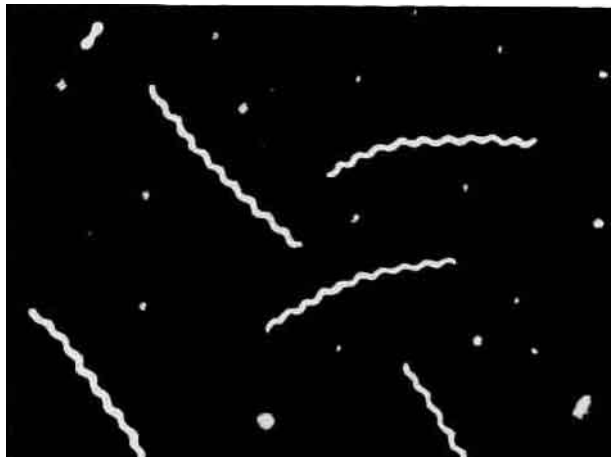
يجب أن لا يغيب عن الذهن أبداً أن استعمال زيت الأرز يتم حصراً في أثناء العمل بالعدسة الزيتية الغاطسة.

١٠. افحص المحضر المجهري عند تمام وضوحه ثم ارسم ما تشاهده على دفترك و عند الانتهاء من العمل اخفض المسرح إلى أدنى مستوى له لتتمكن من سحب الشريحة الزجاجية إذ لا يجوز سحبها و العدسة الشيئية ملاصقة للمحضر المجهري كي لا تتأذى العدسة.

١١. قم بتنظيف المسرح وعدسات المجهر الشيئية و خاصة ذات التكبير 100× بأحد المحاليل سابقة الذكر للتخلص من زيت الأرز و الصبغات العالقة بها.

٢- المجهر الضوئي ذو الحقل المظلم Darkfield microscopy:

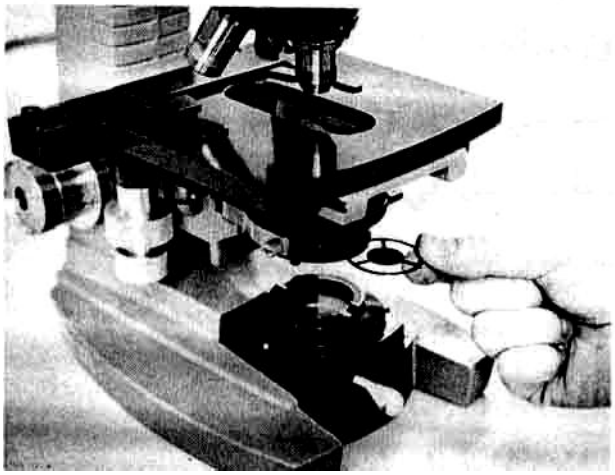
يختلف المجهر الضوئي ذو الحقل المظلم عن سابقه بأن حقل الرؤية يبدو مظلماً، و تبدو الكائنات المفحوصة على هيئة نقاط لامعة في هذا المجال المظلم. (الشكل-٥)



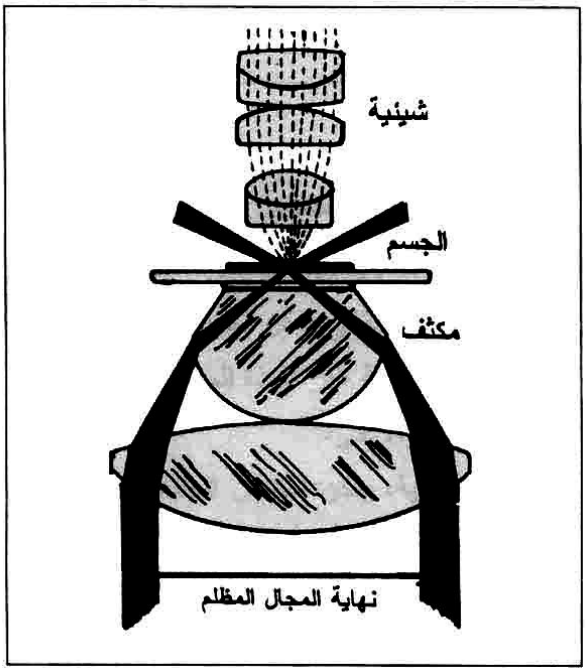
(الشكل-٥) الشكل الذي تبدو عليه الكائنات الحية المفحوصة في المجهر ذي الحقل

يتم الحصول على هذا المجال المظلم بطرق عدة أبسطها يتمثل في إضافة حجاب حلقي Star diaphragm يوضع داخل فلتر المكثف (الشكل- ٦) حيث يقف الجزء المعتم منه حاجزاً في وجه الشعاع الضوئي المستقيم القادم من المكثف، مما يؤدي إلى تشتته و انكساره و تحويل مساره المستقيم إلى شكل مخروط أجوف من خلال المناطق الشفافة للقرص، و بذلك نجد أن الضوء الصادر عن المكثف لا يدخل العدسة الشيئية

إلا ما اصطدم منه بالأجسام و الكائنات الموجودة على الشريحة الزجاجية، لذلك تبدو هذه الأخيرة لامعة في مجال مظلم.(الشكل-٧)



(الشكل- ٦) إضافة الحجاب الحلقي star diapharm إلى فلتر المكثف



(الشكل-٧) مسار الأشعة الضوئية في مجهر مزود بمكثف الحقل المظلم

مما سبق نجد أن المجهر ذو الحقل المظلم يتشابه في أجزائه المختلفة مع المجهر ذو الحقل المضيء باستثناء المكثف، و بالتالي يمكن تحويل مجهر الحقل المضيء إلى مجهر بحقل

مظلم بقصّ قطعة كرتونية غير نفوذة للضوء على شكل أقراص بأبعاد مختلفة ثم تثبيتها على المكثف من الأعلى.

و للحصول على خلفيات ملونة لحقل الرؤية، يمكن استبدال الحلقات السوداء المعتمة بحلقات ملونة معتمة، فتبدو الخلفية بلون أزرق أو أحمر أو أي لون يتم اختياره بينما تبدو الكائنات المفحوصة لامعة و شفافة وسط هذه الخلفية الملونة.

يستخدم المجهر ذو الحقل المظلم في دراسة الشكل الظاهري للخلايا البكتيرية دون تعريضها لمعاملات كيماوية أو حرارية، لأن الصبغات و التسخين قد يشوه المظهر العام للبكتيريا، و لا يعطي صورة دقيقة عن أبعادها الحقيقية. كما يستخدم في فحص محضرات الخلايا الحية بهدف دراسة حركتها (إن وجدت).

و للحصول على أفضل النتائج أثناء الفحص المجهري: اجعل منظم الإضاءة في أعلى درجة له و اجعل فتحة حجاب المكثف كبيرة. ثم حرك عدسات المكثف نحو الأعلى و الأسفل لتحصل على أفضل رؤية.

و من عيوب هذه المجاهر أنها تسمح فقط بفحص الكائنات الحية ذات الأبعاد الكبيرة نسبياً باستخدام عدسات شيئية تكبيرها دون 100× لأن استخدام العدسة الغاطسة قد لا يعطي نتيجة مُرضية في الفحص.

٣- المجهر المتباين الأطوار Phase – contrast microscopy:

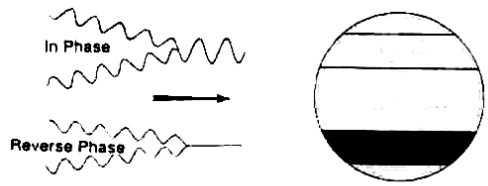
يتطلب دراسة محضرات الخلايا الحية (غير المقتولة) عدم تعريضها للصبغات أو المعاملات الحرارية أو الكيميائية، و لما كانت محتويات الخلية شفافة عموماً – حيث أن الاختلاف في كثافة المكتنفات الخلوية قليل – فإنّه من الصعوبة بمكان رؤيتها بالمجهر الضوئي العادي. لذلك كان لابد من تطوير مجهر يؤمّن تبايناً في الصورة بين الخلية و الوسط المحيط بها من جهة و بين مكونات الخلية فيما بينها من جهة أخرى وذلك من أجل إظهار المكتنفات الداخلية. و لفهم آلية حدوث ذلك لابد من دراسة المصطلحات التالية:

تباين الصورة Image contrast :

إن تباين الصورة التي تُشاهد في الحقل المجهري، ينتج عن وجود نوعين للأجسام:

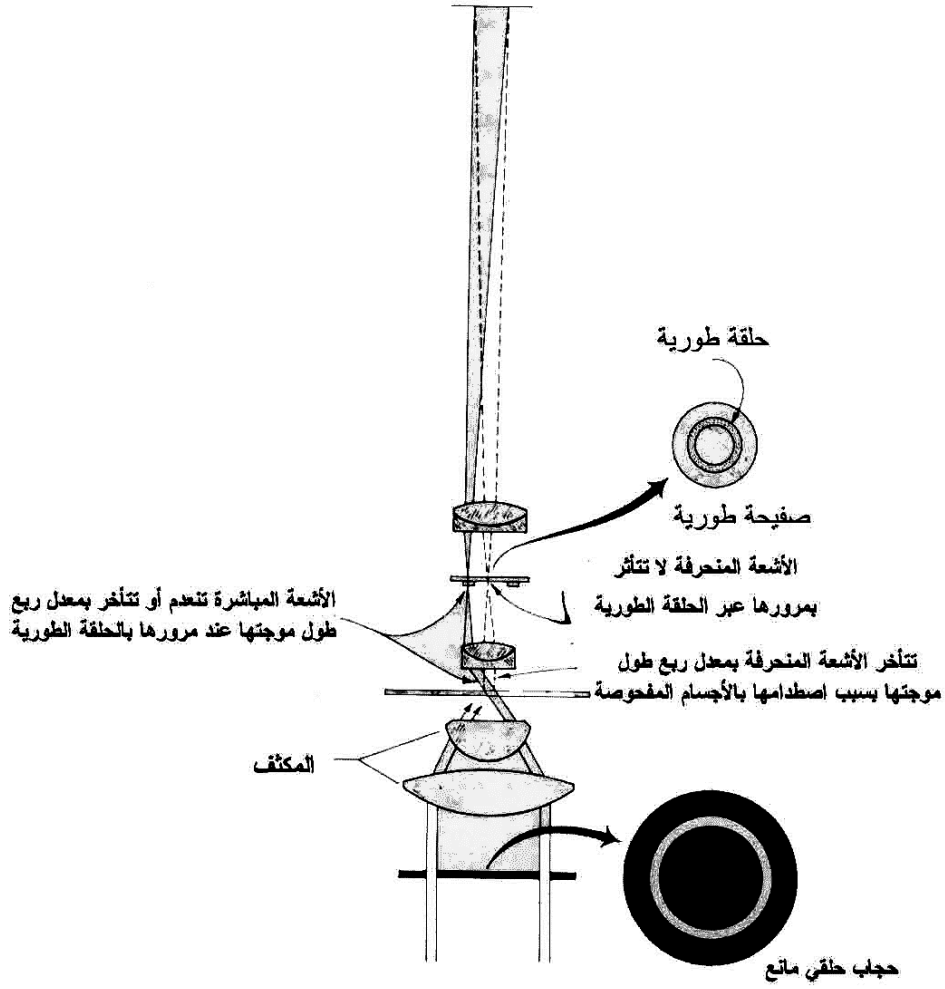
١- أجسام معتمة ذات كثافة مرتفعة Amplitude objects تبدو في حقل الرؤية معتمة لأن الأشعة الضوئية المصطدمة بها لا تنفذ من خلالها.

٢- أجسام طورية شفافة Phase objects و هذه تسمح بمرور الأشعة الضوئية من خلالها، و يتأخر طول موجتها بمعدل الربع دون التأثير على كثافة الضوء الصادر عنها. و لفهم هذا التأخير التباييني Phase shift لابد من دراسة الأشعة المباشرة و المنحرفة في هذا المجهر؛ إن مرور الضوء عبر الأجسام الشفافة نسبياً، يصدر عنها الشعاع الضوئي إمّا مباشراً مستقيماً دون أن يغيّر مساره Direct rays، أو ينحرف الشعاع الضوئي بسبب اصطدامه بأجسام مختلفة الكثافة و يصدر عن هذه الأجسام أشعة منحرفة Diffracted rays يتأخر طول موجتها بمعدل الربع. إن تجميع هذين النوعين من الأشعة المباشرة و المنحرفة في طور واحد هو مبدأ عمل المجهر متباين الأطوار. حيث يحدث تضامناً في الأشعة ذات الطور الواحد مما يقود إلى زيادة في الكثافة الضوئية تؤدي بدورها إلى توهج الجسم الذي تمر خلاله، في حين يحدث تداخل ضوئي بين الأشعة ذات الأطوار المتعاكسة و هذا يؤدي إلى أن يلغي بعضها بعضاً، فتعطي شكلاً مظلماً للأجسام التي تصطدم بها. (الشكل-٨)



(الشكل-٨) لاحظ أن تضامن الأشعة ذات الطور الواحد يؤدي إلى توهج الجسيم في حين أن تداخل الأشعة ذات الأطوار المتعاكسة يؤدي إلى انعدام الضوء وإعطاء شكل مظلم للأجسام

و للحصول على هذه المسارات المختلفة الضوء يضاف إلى المجهر الضوئي العادي مكثف و حجاب من نوع خاص على النحو التالي: (الشكل-٩)



(الشكل-٩) مسارات الضوء عبر المجهر متباين الأطوار

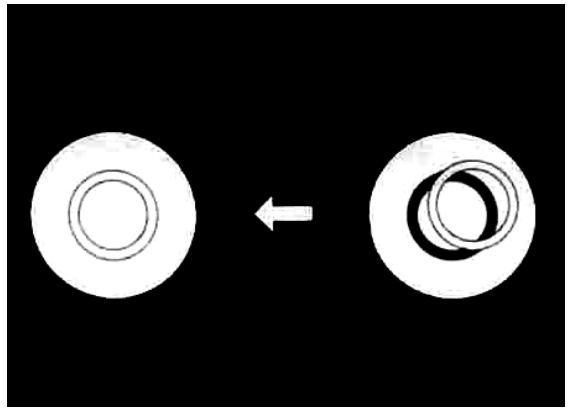
١- حجاب حلقي مانع Annular stop: يثبت أعلى المنبع الضوئي و تحت المكثف. يسمح بمرور الشعاع الضوئي على شكل مخروط أجوف، و يستمر الضوء بهذا الشكل إلى أن يصل إلى الشريحة الزجاجية (المحضر المجهري).

٢- صفيحة طورية Phase plate: عليها حلقة طورية Phase ring توضع في المستوى البؤري الخلفي للعدسة الشيئية. تعمل هذه الحلقة الطورية على تقديم أو تأخير الضوء الصادر عن المحضر المجهري بمعدل ربع طول موجته.

عند مرور الأشعة المباشرة بحلقة الأطوار تنعدم أو تتأخر بمعدل ربع طول موجتها، بينما لا تمر الأشعة المنحرفة عبر حلقة الأطوار، لأنه عند مرورها عبر الأجسام المفحوصة تأخرت بمعدل ربع طول الموجة، و لذلك فعند وصولها إلى الصفيحة الطورية لا تتأثر بالحلقة الطورية الموجودة في العدسة الشيئية للمجهر.

استخدام المجهر متباين الأطوار:

يمكن تحويل أي مجهر ضوئي عادي إلى مجهر متباين الأطوار و ذلك بتغيير المكثف و الحجاب العادي و إضافة المانع الحلقي، و استبدال العدسات الشيئية العادية بعدسات شيئية طورية تحوي كل منها على صفيحة طورية. و حتى يصبح المجهر جاهزاً للعمل يجب مطابقة الحلقة الطورية الموجودة في العدسة الشيئية مع المانع الحلقي الموجود أسفل المكثف بحيث يتركزان معاً كما في (الشكل-١٠) مع ملاحظة تكرار عملية المطابقة لكل عدسة شيئية على حدة، لأن لكل عدسة شيئية طورية فتحة مكثف و حجاب خاص بها.



(الشكل-١٠) مطابقة الحلقة الطورية مع المانع الحلقي

٤- مجهر الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet microscopy:

يعتمد مبدأ عمل هذا المجهر على استخدام أشعة الضوء فوق البنفسجية القصيرة غير المرئية لإضاءة الجسم المفحوص بدلاً من أشعة الضوء العادي، و هذا من شأنه زيادة القدرة الإيضاحية للمجهر (راجع بداية الفصل – قوة التمييز) بحيث يمكن بواسطته تمييز جسمين يبعدان عن بعضهما مسافة ٠.١ ميكرون. و بذلك يمكن زيادة قوة التكبير مرتين إلى ثلاث مرات عن تلك المتحصل عليها من المجهر الضوئي. كما يختلف عن المجهر الضوئي باستخدامه عدسات شيئية مصنوعة من الكوارتز بدلاً من الزجاج، كما تغيب العدسات العينية عن تركيبة مجهر الأشعة فوق البنفسجية نظراً لأن هذه الأشعة غير مرئية لعين الفاحص و تستبدل بكاميرات تصوير فوتوغرافية تصور العينة المفحوصة ثم تتم دراستها.

لتجهيز محضرات الخلايا المفحوصة بمجهر الأشعة فوق البنفسجية يتم صبغها بأصبغة فلورسينتيّة Fluoresent خاصة. و من أهم استخدامات هذا المجهر في المجال الطبي هو الكشف عن مسببات بعض الأمراض الخطيرة مثل مرض السل المتسبب عن بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis* حيث يتم صبغ العينة بصبغة فلورسينتية خاصة تدعى auramine–O فتبدو البكتيريا بلون أصفر في حقل مظلم و كذلك للكشف عن بكتيريا الجمرة الخبيثة *Bacillus anthrax* حيث تصبغ العينة بصبغة فلورسينتية هي (FITC) فلورسين ايزو ثيوسيانات؛ فتبدو البكتيريا بلون أخضر وسط حقل الرؤية المظلم.

٥- المجهر الإلكتروني Electron microscopy :

يعتمد مبدأ عمل هذا المجهر على استخدام موجات إلكترونية ذات أطوال قصيرة جداً بدلاً من الضوء العادي، مما يزيد القدرة الإيضاحية مئات المرات عمّا هو متاح في المجهر الضوئي، بحيث يمكن التمييز بين جسمين يبعدان عن بعضهما مسافة ٠.٠٠٠١ ميكرون، و بالتالي يمكن أن تصل قوة التكبير حتى مليون مرة.

يمر الإشعاع الإلكتروني في المجهر الإلكتروني من خلال سلسلة من المجالات المغناطيسية التي توجّه الإلكترونات بطريقة تشبه عمل العدسات في المجهر الضوئي، و بذلك فإن الإلكترونات التي تنفذ أو تنعكس في العينة المفحوصة توجّه لتشكل صورة مكبرة، يمكن تصويرها على لوحات حسّاسة أو مشاهدتها على شاشة عرض مفسفرة تسمح برؤية الصورة لامعة. و هناك نوعان من المجاهر الإلكترونية:

٥-١ المجهر الإلكتروني النافذ (النفّاذ) Transmission electron microscopy:

يستخدم هذا النوع من المجاهر في دراسة التفاصيل الداخلية الدقيقة لمكونات العينة المفحوصة، و يشترط قبل الدراسة تحضير العينة المفحوصة بإجراء مقاطع رقيقة جداً فيها (٣٠- ٦٠ نانومتر) و تسبق هذه العملية سلسلة من العمليات المعقدة التي تحتاج إلى وقت طويل، حيث يجري للعينة تثبيت Fixation للمحافظة على تركيبها ثم تجفيف Dehydration لإزالة المثبتات الزائدة ثم طمر Embedding في شمع البرافين أو البلاستيك لمنع تشوه العينة عند إجراء المقاطع. و بعد الانتهاء من تجهيز المقاطع في العينة يتم صبغها لزيادة التباين في أجزاء العينة.

يمتاز هذا النوع من المجاهر بقدرة إيضاحية عالية مقارنة مع النوع الثاني للمجاهر الإلكترونية إلا أنه يعاب عليه صعوبة تجهيز المحضرات و تعرضها للتشوه في أثناء التحضير.

٥-٢ المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscopy:

يستخدم هذا النوع من المجاهر في دراسة السطوح الخارجية للعينات و إظهار التفاصيل الدقيقة. أي تعطي صورة ثلاثية الأبعاد للعينة المفحوصة.

يمتاز هذا المجهر بسهولة التشغيل و تجهيز المحضرات للفحص حيث لا تتطلب تحضيرات طويلة و معقدة كسابقتها و يمكن في بعض الحالات فحص العينات دون أي تحضير مسبق و بالتالي لا تتعرض العينات المفحوصة لأي تشويه.

من أهم استخداماته، دراسة السطوح الخارجية لبلورات الفيروسات و بعض أنواع البكتيريا.

الفصل الثاني
التعقيم

التعقيم هو التخلص التام من كافة صور الحياة في وسط ما. و يتم ذلك بقتل تلك الكائنات الحية أو إزاحتها عن الوسط المراد تعقيمه، بحيث يكون الوسط المعقم خالياً من أيٍّ من الكائنات الحية:بكتيريا أو فطور أو أبواغ Spores.. أو غيرها من الأحياء.

يتم التعقيم بطرق عدة و مختلفة و ذلك حسب الخواص الفيزيائية و الكيميائية للمواد و الأوساط المراد تعقيمها.

طرق التعقيم:

- التعقيم الفيزيائي Physical sterilization.
- التعقيم الكيميائي Chemical sterilization.
- التعقيم الحيوي Biological sterilization.

أولاً: التعقيم الفيزيائي

١- التعقيم بالحرارة:

و هي من أكثر طرق التعقيم استعمالاً نظراً لسهولة استخدامها، و قلة كلفتها الاقتصادية، و فعاليتها في قتل خلايا الكائنات الحية عن طريق تخريب نظامها الأنزيمي. و تعتمد درجة الحرارة اللازمة للتعقيم على قدرة خلايا الكائنات الحية على تحمل الحرارة المرتفعة والتي يُعبر عنها بنقطة الموت الحرارية (TDP) Thermal death pointو يقصد بها أقل درجة حرارة كافية لقتل جميع خلايا الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في وسط ما خلال مدة ١٠ دقائق. و هنا لابد من تحديد زمن الموت الحراري (TDT) Thermal death time و يقصد به أقل فترة زمنية كافية لقتل ٩٠% من الكائنات الحية الدقيقة في وسط ما عند درجة حرارة ثابتة.

يُعبَّر عن اجتماع هذين المصطلحين (TDT،TDP) بنظام التعقيم و يعني درجة الحرارة المثلى و الزمن الأمثل لتعقيم وسط ما.

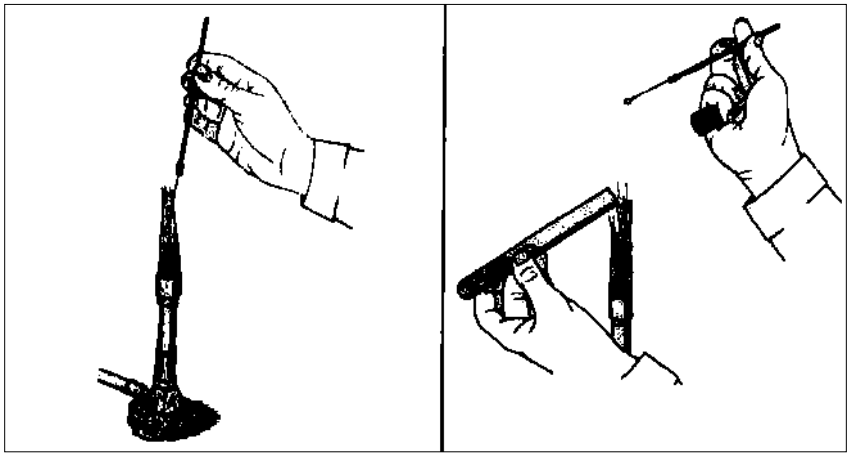
يتم استخدام الحرارة في التعقيم بطريقتين:

١-١- التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat sterilization

تعمل الحرارة الجافة على قتل الكائنات الحية الدقيقة بفعل الأكسدة Oxidation و تتم بطريقتين:

١-١-١- التعقيم باللهب المباشر (التلهيب) Flaming :

وهي من أبسط طرق التعقيم بالحرارة الجافة حيث تنطوي هذه الطريقة على تعريض الأشياء المراد تعقيمها مباشرة للهب، و يستخدم من أجل ذلك المصباح الكحولي أو الغازي و بهذه الطريقة تعقم الأبر اللاقحة حيث تعرض للهب مباشر حتى تصل لدرجة الاحمرار، على أن يكون كامل الجزء المعدني للإبرة ضمن اللهب و ليس رأس الأبرة فقط، كما يستخدم اللهب المباشر في تعقيم الشرائح الزجاجية و الملاقط و السكاكين و المشارط و القضبان الزجاجية و فوهات الحوجلات و أنابيب الاختبار الحاوية على مزارع ميكروبية أثناء فتحها.(الشكل-١١)



(الشكل-١١) استخدام اللهب في تعقيم الإبرة اللاقحة وفوهة أنبوب الاختبار

و يمكن زيادة كفاءة التعقيم بهذه الطريقة بمعاملة الأدوات المراد تعقيمها بالكحول الإيتيلي ثم تعريضها للهب مباشر و هذه الطريقة تدعى التلهيب الكحولي Alcohol flaming. هناك بعض أجهزة التعقيم التي تعتمد في عملها على اللهب تسمى قاذفات

اللهب تستعمل في تعقيم الحظائر و المداجن حيث تعامل الأرضيات و الأسقف و الجدران بمواد كيماوية ثم يمرر عليها اللهب.

١-١-٢- التعقيم بالهواء الجاف الساخن Hot air sterilization :

و يستخدم لذلك فرن الهواء الساخن (فرن باستور – فرن كوخ) و هو عبارة عن صندوق معدني مزدوج الجدران لتحمّل درجات الحرارة العالية. ترتفع حرارته باستخدام الغاز أو الكهرباء، و يكون مزوّداً بمنظم حرارة و ميزان لقياس درجة الحرارة و ميقاتية لضبط زمن التعقيم، يحوي بداخله رفوف من الشبك تسمح بتغلغل الهواء الساخن و انتشاره بين المواد المراد تعقيمها.

تعقم فيه الزجاجات المختلفة مثل: الممصات، أطباق بتري، الماسحات الزجاجية وكذلك الأدوات المعدنية من أبر لاقحة و مشارط و مقصات و غيرها..

نظام التعقيم فيه: ١٦٠° م لمدة ساعتين أو ١٧٠° م لمدة ساعة واحدة.

يفضل عند تعقيم أطباق بتري لفّها بورق معدني أو ورق عادي للحفاظ عليها معقمة لفترة طويلة قبل استخدامها و يتم ذلك على النحو التالي:

يوضع زوج من الأطباق على ورقة مربعة الشكل، طول ضلعها يساوي ثلاثة أضعاف قطر الطبق، ثم تطوى من الجانبين بشكل متقابل أمّا الطرفان الآخران للورقة فيطويان للأسفل.

كما يتم تحضير الممصات للتعقيم على النحو التالي:

يوضع في نهاية الممص العلوية قطعة مفتولة من القطن، ثم يوضع الممص على ورقة مربعة تقريباً يزيد طولها طول الممص (٨–١٠) سم و يلف الورق على الممص حتى تمام تغليفه ثم يوضع ممص آخر و نتابع عملية اللّف على ذات الورقة بحيث يفصل بين الممص و الآخر طبقة من الورق... و هكذا بالنسبة لبقية الممصات على ألا يتجاوز عدد الممصات (٦) ممصات. بعدها تطوى نهايتي الورقة المستخدمة نحو الداخل و يربط الجانبان بخيوط قطنية، و يُكْتَب على الورقة من الخارج ما يدل على عدد وسعة و اتجاه فوهة الممصات، و يُدَلّ على اتجاه الممص برسم سهم على الورقة رأسه باتجاه الرأس

المدبب للممص، و هذا يفيد عند استخدام الممصات بعد تعقيمها بحيث يتم سحب الممص من جهة فوهته العليا كي لا يتلوث باليد.

أمّا أنابيب الاختبار و الدوارق الفارغة فيجب إحكام إغلاقها بسدادات قطنية أو ورق معدني قبل إدخالها الفرن.

بعد تجهيز الأدوات المراد تعقيمها توضع في الفرن بشكل غير متزاحم يسمح بتغلغل الهواء الساخن بينها بشكل متجانس، كما يجب إبعادها عند جدران الفرن كي لا يحترق الورق الملفوفة به و كي لا تنكسر الزجاجيات غير الملفوفة بالورق. ثم يحكم إغلاق الفرن و يتم ضبط الحرارة اللازمة للتعقيم و ضبط ميقاتية الفرن على زمن التعقيم الموافق لدرجة الحرارة. و عند انتهاء التعقيم يُنتظر حتى تنخفض حرارة الفرن إلى درجة حرارة الغرفة (المخبر) قبل فتحه تجنباً لكسر الزجاجيات بفعل الفروق في درجات حرارة الهواء داخل الفرن و خارجه.

ملاحظة:

لا يُعقم بهذه الطريقة كل من: الأوساط المغذية والمواد السائلة و المحاليل الفيزيولوجية والمواد الكيماوية القابلة للاشتعال و لا يُدخل إلى الفرن أي مادة بلاستيكية أو أي لاصق قابل للذوبان عند درجات الحرارة المرتفعة.

١-٢- التعقيم بالحرارة الرطبة Moist heat sterilization :

يعتمد مبدأ التعقيم بالحرارة الرطبة على استخدام بخار الماء بدلاً من الهواء الساخن في التعقيم. و عادةً ما تكون الحرارة الرطبة أكثر كفاءة في قتل الخلايا الحية من الحرارة الجافة، و ذلك لأنها أكثر قدرة على اختراق جدران الكائنات الحية و أبواغها و التغلغل داخل الخلية، كما أنها أسرع في تخثير البروتين الخلوي.

يمكن تلخيص طرائق التعقيم بالحرارة الرطبة كما يلي:

١-٢-١- الغلي Boiling:

و هو أبسط طرق التعقيم بالحرارة الرطبة. و تتم العملية برفع درجة حرارة الماء إلى ١٠٠ م و هي درجة الغليان عند مستوى سطح البحر، و هذه الدرجة كافية لقتل

جميع صور البكتيريا الممرضة و أغلب الفيروسات و الفطريات خلال ١٥ دقيقة من الغليان. و تستطيع أبواغ بعض البكتيريا و بعض أنواع الفيروسات تحمل درجة الغليان لمدة أطول تصل حتى ٢٠ ساعة. من هنا نجد أن التعقيم بالغلي لا يمكن اعتماده في كثير من الحالات. و مع ذلك فإن غليان السوائل كالماء و الحليب لمدة ١٥دقيقة يكفي للقضاء على الصور الخضرية للبكتيريا الممرضة. يمكن زيادة كفاءة التعقيم بهذه الطريقة بإضافة ٢-٣% من محلول كربونات الصوديوم إلى ماء الغلي لأنه يدخل إلى محفظة البكتريا و المواد الدسمة مما يسمح بزيادة تأثير الحرارة فيها. تستخدم هذه الطريقة في تعقيم الشرائح الزجاجية و الإبر اللاقحة و المقصات و المشارط...

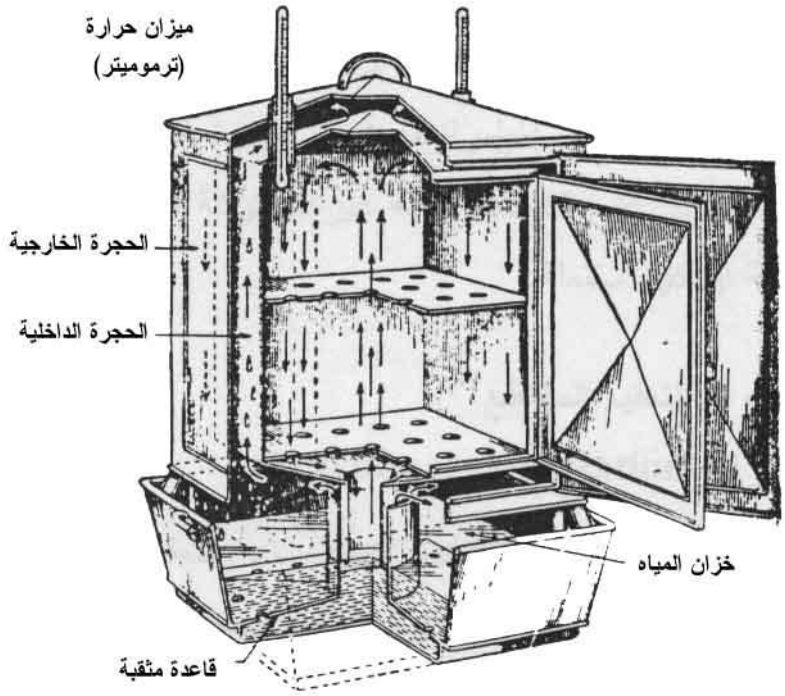
١-٢-٢- البسترة Pasteurization :

لما كانت البكتريا الممرضة معظمها غير متبوغة، فإن القضاء عليها يتم بدرجات حرارة أقل من ١٠٠ م، و هذه الطريقة اقترحها العالم الفرنسي Louis Pasteur و إليه تنسب تسمية هذه الطريقة، و هي تستخدم على نطاق واسع في مجال الصناعات الغذائية عند معاملة الحليب و عصير الفاكهة التي تُعقم بدرجة (٧٥-٨٥ م) من خلال إمرارها ضمن أجهزة خاصة مدة نصف دقيقة فقط، و بذلك فهي تؤثر على الكائنات الحية غير المتبوغة فقط و بالتالي فهي تعد عملية تعقيم جزئية أو غير مكتملة.

١-٢-٣- التندلية – أو التعقيم المتقطع

:Fractional sterilization / Tyndalization

تعود تسمية هذه الطريقة إلى العالم تاندل، كما تُعرف بالتعقيم المتقطع لأن العملية تتم على ثلاث فترات خلال ثلاثة أيام متتالية. تجري عملية التعقيم في جهاز خاص يُدعى معقم آرنولد Arnold sterilizer (الشكل-١٢) و هو عبارة عن صندوق معدني مغلف بطبقة خارجية عازلة للحرارة. مزود برفوف معدنية مثقبة تسمح بتغلغل بخار الماء الذي يصعد من أسفل الجهاز عندما ترتفع درجة حرارته إلى درجة الغليان.



(الشكل–١٢) الجهاز المستخدم في التعقيم المتقطع

يعتمد مبدأ الطريقة على أن الخلايا البكتيرية الخضرية (الإعاشة) تموت عند تعرضها لبخار الماء على درجة ١٠٠ م لمدة ٣٠ دقيقة، أما الأبواغ فإنها تقاوم حرارة الغليان لمدة طويلة قد تصل لعدة ساعات، و للقضاء على تلك الأبواغ يتم تحضين الأوساط المراد تعقيمها لتشجيع إنبات تلك الأبواغ و تحولها إلى الحالة الخضرية ليسهل القضاء عليها بدرجة الغليان فيما بعد، و تتم الطريقة على النحو التالي:

في اليوم الأول للتعقيم توضع المواد المراد تعقيمها في الجهاز و تُعرّض لدرجة الغليان مدة ٥٠–١ ساعة حسب طبيعة و كمية المادة المراد تعقيمها، ثم تُترك لتبرد و تُحضن عند الدرجة ٣٠ م أو عند درجة حرارة المخبر مدة ٢٤ ساعة للسماح للأبواغ بالإنبات، و في اليوم الثاني تُعاد عملية التعقيم بنفس الطريقة السابقة للقضاء على ما أنبت من أبواغ، و في اليوم الثالث تكرر العملية للتأكد من تمام التعقيم.

من سلبيات هذه الطريقة أن بعض الأبواغ البكتيرية لا تنبت حتى و لو تعرضت لدرجة حرارة مناسبة، و ذلك لكون الوسط المراد تعقيمه غير مناسب لإنباتها، و بالتالي

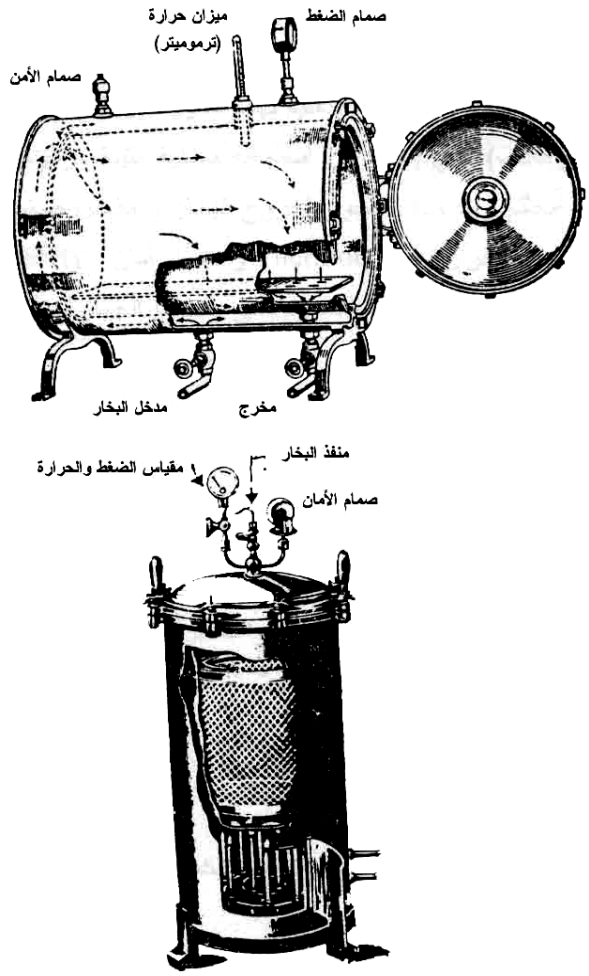
فهي تبقى فيه و تلوثه. كما أن البكتيريا اللاهوائية إجبارياً لن تنبت أبواغها طالما أن الوسط بقي معرّضاً لظروف هوائية.

تستخدم هذه الطريقة في تعقيم الأوساط التي تتغير خواصها عند تعرضها لدرجات حرارة تزيد عن ١٠٠ م، و خاصة الأوساط المغذية الحاوية على الجلاتين أو الحليب أو السكريات أو المواد الطيارة، التي لا يمكن تعقيمها على درجات حرارة تزيد عن درجة الغليان خوفاً من تحللها و تغيّر خواصها الفيزيولوجية.

١-٢-٤- التعقيم بالبخار مع الضغط Steam under pressure أو التعقيم بالصاد الموصد (الأوتوكلاف) Autoclaving:

يعتمد مبدأ الطريقة على استخدام بخار الماء الذي تزيد درجة حرارته عن درجة الغليان، و ذلك بزيادة الضغط المطبق، و تعتبر هذه الطريقة من أفضل طرق التعقيم و أكثرها كفاءةً، حيث يتم بواسطتها التخلص من كافة صور الحياة الخضرية (الإعاشية) و المتبوغة. تجري عملية التعقيم بهذه الطريقة بواسطة جهاز الصاد الموصد (الأوتوكلاف) (الشكل-١٣) الذي يتألف من اسطوانة معدنية متينة مزدوجة الجدران، مغطاة بغطاء محكم و مزودة بصنبور لخروج البخار و مقياس ضغط Manometer و مقياس درجة الحرارة Thermometer و صمّام أمان Safety valve يُفتح آلياً (ذاتياً) عند زيادة الضغط عن الحدود التي يتحملها الجهاز و ذلك لدرء خطر الانفجار. و أحياناً يزود الجهاز بميقاتية لضبط الوقت و مؤشر رقمي يدل على درجة الحرارة داخل الجهاز و منبّه يلفت انتباه العامل إلى انتهاء زمن التعقيم.

هناك أنواع مختلفة من أجهزة التعقيم بالبخار مع الضغط، بعضها كهربائي و البعض الآخر يستخدم الغاز في تسخين الماء —كما تختلف تلك الأجهزة في سعتها حسب الحاجة إليها، حيث تكون متوسطة أو صغيرة في مخابر الأحياء الدقيقة بينما تبلغ أحجاماً كبيرة في معامل تصنيع المعلبات حيث تستعمل رافعات لوضع و إخراج المعلبات قبل و بعد تعقيمها داخل الجهاز.



(الشكل–١٣) الصاد الموصد (الأوتوكلاف) لتعقيم المواد بالبخار تحت الضغط

طريقة استعمال الأوتوكلاف الكهربائي:

١- توضع كمية من الماء المقطر في الجهاز بحسب الكمية المنوّه عنها بدليل تشغيل الجهاز.

٢- توضع المواد أو الأدوات المراد تعقيمها ضمن سلة Basket موجودة داخل الجهاز بشكل غير متزاحم يسمح للبخار بالتغلغل خلالها.

٣- يغلق غطاء الجهاز بإحكام.

٤- يشغل الجهاز مع إبقاء صنبور البخار مفتوحاً حتى يتم طرد الهواء من داخل الجهاز بالكامل.

٥- يغلق صنبور خروج البخار عند وصول الماء داخل الجهاز لدرجة الغليان ١٠٠°م حيث يُلاحظ خروج البخار مستمراً، و هذه المرحلة مهمة في التعقيم لأن بقاء الهواء مختلطاً مع البخار يقلل من درجة حرارة التعقيم، و بالتالي يجب عدم إغلاق صنبور البخار قبل التأكد من طرد الهواء بالكامل من داخل الجهاز و حلول بخار الماء محلّه.

٦- يتم ضبط المؤشر الحراري أو ضبط الضغط الذي يوافق درجة الحرارة المراد التعقيم عندها. ثم يحسب زمن التعقيم بدءاً من لحظة وصول مؤشر الحرارة إلى المستوى المطلوب، و يتم الانتظار حتى انقضاء فترة التعقيم.

٧- تُصدر بعض الأجهزة الحديثة إنذاراً صوتياً أو ضوئياً بانتهاء زمن التعقيم و عندها يُطفأ الجهاز و يُفْتَح صنبور خروج البخار بحذر و بطء حتى ينخفض الضغط داخل الجهاز إلى الصفر و هذا ما يشير إليه مؤشر الضغط، و يفضل أن يُترك الجهاز حتى انخفاض الضغط دون تدخل لأن الانخفاض المفاجئ في الضغط يؤدي إلى نزع السدادات القطنية التي تغلق الحوجلات وأنابيب الاختبار.

٨- يُرفع غطاء الأوتوكلاف بحذر بحيث يكون وجه العامل بعيداً عن فوهة الجهاز كي لا يتأثر بالبخار شديد السخونة الخارج من الجهاز.

يعقم بهذه الطريقة:الأوساط المغذية، الماء، الأغذية المعلبة، الملابس، الشاش، القطن، السدادات الكوتشوكية، الخراطيم و المرشحات المختلفة.

كما تستخدم هذه الطريقة لإتلاف المزارع البكتيرية القديمة التي تم دراستها في المخبر من أجل التخلص منها.

تتوقف درجة الحرارة المطبقة و زمن التعقيم بالأوتوكلاف على تركيب المادة المراد تعقيمها فالأوساط المغذية الحاوية على سكريات و فيتامينات تعقم عادة عند درجات حرارة أدنى و بوقت أطول.

يبين (الجدول-١) درجات الحرارة و قيم الضغط الموافقة.

الضغط (جوي)	درجة الحرارة C°
٠.٥	١١٥
١.٠	١٢٠
١.٥	١٢٧
٢	١٣٣

ملاحظة: يفضل التعبير عن الضغط بالباسكال حيث أن :

١ ضغط جوي = $1,01325 .10^5$ باسكال ≈ ١٠٢ كيلو باسكال.

اختبار كفاءة التعقيم بالأوتوكلاف:

يجرى اختبار كفاءة التعقيم للتأكد من أن درجة الحرارة التي تظهر على مقياس الحرارة و قيمة الضغط التي تظهر على مقياس الضغط هي قيم حقيقية للضغط و الحرارة داخل الجهاز، و يتم التأكد من ذلك بطريقتين:

أ- الطريقة البيولوجية:

تعتمد الطريقة على تعقيم أنبوب اختبار يحتوي مزارع لعصيّات متبوغة مثل *Bacillus mesentericus* أو *Bacillus subtilis* ثم يُنقل الأنبوب ليحضّن عند درجة حرارة مناسبة لنمو تلك الأنواع و بعد التحضين يُسجل وجود أو انعدام النمو البكتيري. فإن انعدم النمو دلّ ذلك على كفاءة التعقيم لأن درجة الحرارة القاتلة لتلك البكتيريا هي ١٢١م عند تعرضها مدة ١٢ دقيقة.

ب– الطريقة الكيميائية:

تعتمد الطريقة على استخدام مواد ذات درجات انصهار معروفة و تعريضها لظروف التعقيم (درجة الحرارة) داخل الجهاز. إن انصهار تلك المواد يعني أن درجة الحرارة داخل الجهاز قد وصلت إلى تلك الدرجة المعلومة. و يستخدم لذلك الكبريت (درجة انصهاره ١١٩° م) و اليوريا (درجة انصهارها ١٣٢° م).

٢– التعقيم بالأشعة Sterilization by radiation :

تُحدث الأشعة –بصورة عامة– اضطرابات في الخلية تختلف حسب نوع الأشعة و شدتها و مدة التعرض لها. فقد تؤدي إلى قتل خلايا الكائنات الحية الدقيقة أو إحداث طفرة فيها.

من الأشعة المستخدمة في التعقيم:

٢–١– الأشعة فوق البنفسجية Ultra – violet rays:

تُستخدم هذه الأشعة في تعقيم غرف العزل وغرف العمليات الجراحية و ردهات المشافي و المخابر و أحياناً في تعقيم بعض المنتجات الغذائية و يستخدم لذلك مصابيح خاصة تصدر أشعة فوق بنفسجية طول موجتها يتراوح بين (٢٥٠–٢٨٠ نانومتر) و أفضل موجة فعّالة في مقاومة البكتيريا تلك التي يبلغ طول موجتها ٢٦٠ نانومتر، حيث تقضي على الخلايا الإعاشية و المتبوغة للبكتيريا عن طريق التأثير على DNA الخلية و تدميره مما يؤدي إلى وقف تكاثر الخلية و موتها.

يُعاب على تلك الأشعة ضعف قدرتها على التغلغل حيث أن طبقة رقيقة من القماش أو الورق قد تحجز نسبة كبيرة منها، و لذلك فإن فعلها غالباً ما يكون سطحياً. كما أن طول فترة التعرض لها يؤدي إلى الإصابة بسرطان الجلد و التهاب قرنية العين لذلك لا يجوز الدخول إلى الأماكن المشعة بالأشعة فوق البنفسجية أثناء عمل المصابيح.

٢-٢- الأشعة السينية X-rays:

تُعد الأشعة السينية أكثر فتكاً بالكائنات الحية الدقيقة مقارنة بالأشعة فوق البنفسجية و يعود السبب في ذلك إلى أن طول موجتها أقصر. و بما أن الأشعة السينية من الأشعة المؤيَّنة Ionizing radiation فهي تمتلك قدرة عالية على الاختراق و تدمير خلايا الكائنات الحية الدقيقة عن طريق تأثيرها على المادة الوراثية للخلية مما يؤدي إلى إحداث طفرات فيها وذلك عند استخدام تراكيز منخفضة من تلك الأشعة، أو قتل تلك الخلايا عند استخدام كميات كافية من تلك الأشعة.

تُستخدم الأشعة السينية في تعقيم و حفظ المواد الغذائية لمنع فسادها وقد يُعاب عليها الخوف من الأثر المتبقي للإشعاع على أجسام مستهلكي تلك الأغذية. كما أن ارتفاع تكاليف إنتاجها و حاجتها لأجهزة خاصة جعل استخدامها محدوداً و غير عمليّ.

٣- التعقيم بالترشيح Sterilization by filtration:

يتم بهذه الطريقة من التعقيم (بخلاف باقي طرق التعقيم) إزاحة الكائنات الحية الدقيقة من الوسط المراد تعقيمه (سوائل، هواء) دون قتلها، و يُستخدم لذلك مرشحات مختلفة المسامية تعمل على حجز الكائنات الحية الدقيقة و السماح للهواء أو السوائل بالمرور خلالها. يختلف مسام تلك المرشحات حسب نوع الكائنات المراد إزاحتها حيث يُستخدم لترشيح السوائل الحاوية على بكتيريا مرشحات تتراوح أقطار مسامها ٠.٢٢- ٠.٤٥ ميكرون أما مرشحات الفيروسات فتكون أقطارها ذوات ٠.٠١ ميكرون.

تستخدم طريقة التعقيم بالترشيح في تعقيم السوائل التي لا يمكن تعقيمها بالطرق الحرارية أو الكيميائية أو الإشعاعية حيث تعمل تلك الطرق على إحداث تغيرات في السوائل بحيث تؤدي إلى تخريبها و مثال تلك السوائل المضادات الحيوية و بعض الأوساط المغذية و الأنزيمات و اللقاحات...

كما تستخدم هذه الطريقة للحصول على المواد الغذائية التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة نتيجة عملياتها الاستقلابية.

و قد يُلجأ إلى عملية التعقيم بالترشيح لمعرفة محتوى السوائل من الكائنات الحية الدقيقة و ذلك برفع أقراص الترشيح (بعد انتهاء عملية الترشيح) ووضعها على وسط مغذٍ مناسب و تحضينها عند درجات حرارة مناسبة لتنميتها و دراستها، أو يتم فحص الكائنات الحية الدقيقة المحجوزة على سطح المرشح تحت المجهر بعد صبغها بطرق مختلفة و ذلك بحسب الهدف من الدراسة (سنأتي على ذكر ذلك لاحقاً).

وفي العادة تستخدم مضخة تفريغ لتسهيل إمرار السائل بسرعة عبر أقراص الترشيح.

ملاحظة:

تتم كافة مراحل التعقيم بالترشيح في ظروف عقيمة بدءاً من تعقيم دورق الاستقبال و كافة أجزاء جهاز الترشيح بما فيها أقراص الترشيح (يوجد في الأسواق أقراص ترشيح معقمة) و استخدام ملاقط معقمة في أثناء وضع الأقراص أو رفعها، و انتهاءً بإجراء الترشيح الذي يجب أن يتم في جوّ معزول عن الهواء الملوث (غرفة العزل).

و للمرشحات أنواع عديدة تختلف فيما بينها بنوع المادة التي يُصنع منها المرشح – أهمها:

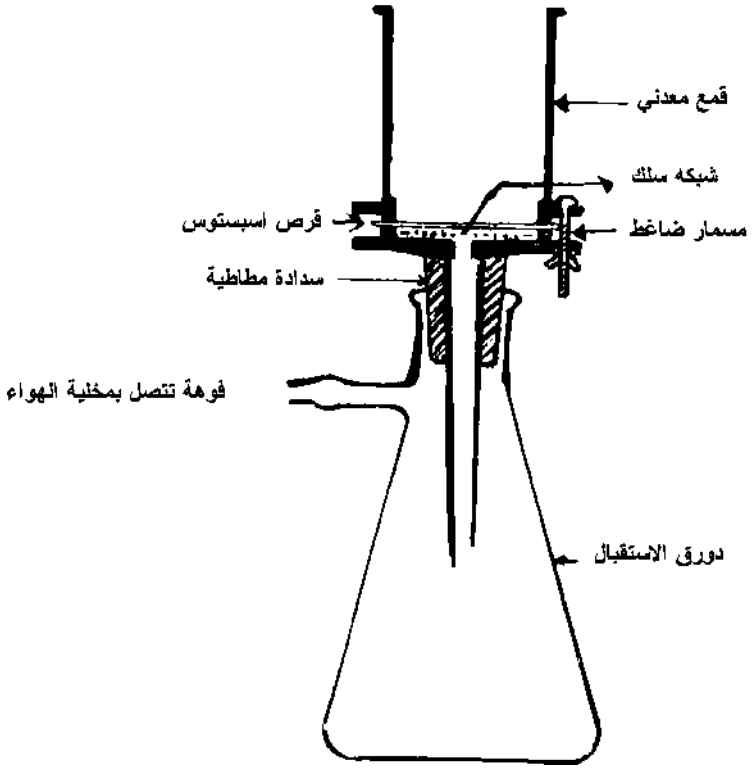
أ– مرشحة شمبرلاند Chamberland filter:

تتألف هذه المرشحة من أسطوانة خزفية ضمن أسطوانة معدنية، تعمل بضغط المياه حيث تتصل الأسطوانة الخزفية بأنبوب المياه المراد تعقيمها بينما تتصل الأسطوانة المعدنية بصنبور لجمع المياه المعقمة، و عادة ما تكون الأسطوانة الخزفية ذات درجات مسامية مختلفة.

ب– مرشحة زايتس Zeites Filter:

و هنا يكون المرشح مصنوعاً من الأسبستوس أو الأميانت على شكل أقراص توضع بين قرصين معدنيين يتصل أحدهما بقمع لصب السائل المراد تعقيمه و الآخر بدورق الاستقبال لجمع السائل المعقم و يكون دورق الاستقبال مزوداً بفتحة جانبية

تتصل بمخلية هواء تعمل على إحداث اختلاف في الضغط على جانبي القرص و ذلك لتسهيل مرور السائل.(الشكل-١٤)



(الشكل-١٤) قطاع طولي في مرشح زايتس Zeites filter

هناك أنواعٌ عديدةٌ من أقراص الترشيح أشهرها تلك التي يُرمز لها EK و هي ذات مسامات كبيرة، أما الأقراص التي رمزها EKSII, EKSI, EKS فهي ذوات مسامات دقيقة تحجز البكتيريا.

جـ- مرشحة بيركفيلد Berkefeld filter:

تشبه مرشحة زايتس من حيث الشكل العام، لكن المرشح هنا مصنوع من الطين الدياتومي Diatomaceous earth و يوجد منها ثلاثة أنواع تبعاً لقطر مسامها:

W – قطر مسامها ٣-٤ ميكرون.

N – قطر مسامها ٥-٧ ميكرون.

V – قطر مسامها ٨-١٢ ميكرون.

د- المرشحات الغشائية Membrane filters:

تصنع هذه المرشحات من مواد مختلفة مثل أسترات السللوز، و هي تمتاز بسهولة الاستخدام حيث يمكن استبدالها بسهولة أو إعادة تعقيمها في الأوتوكلاف على درجة حرارة لا تزيد عن ١٢٥ م ثم استخدامها ثانية. تمتاز مسامها بتجانس كبير. و لتلك المرشحات عدة أنواع تختلف فيما بينها حسب الهدف من استخدامها و من أشهرها:

HA قطر مسامها ٠.٤٥ ميكرون

GS قطر مسامها ٠.٢٢ ميكرون

وكلاهما يستخدمان في ترشيح البكتيريا.

أما تلك التي تستخدم لحجز الفيروسات فتبلغ أقطار مسامها ٠.٠١ ميكرون.

تستخدم هذه المرشحات عند التقدير الكمّي للبكتيريا في الماء و السوائل المختلفة مثل الحليب.

٤- التعقيم بالأمواج فوق الصوتية:

و يستخدم لذلك أجهزة تطلق أمواجاً فوق صوتية، تعمل على تهتك الجدار الخلوي للبكتيريا، و تستعمل هذه الطريقة في تعقيم الحليب و بعض المنتجات المعلبة.

ثانياً: التعقيم الكيميائي:

يمتاز التعقيم الكيميائي عن التعقيم الفيزيائي بعدم حاجته لاستعمال أجهزة خاصة، بل يعتمد على استخدام مواد كيميائية ذوات تأثيرات مختلفة على الكائنات الحية الدقيقة فبعضها يكون قاتلاً لها و بعضها الآخر مثبطاً لنموها، كما تختلف تلك المواد فيما بينها بالتركيب الكيميائي. و يمكن تلخيص آلية تأثير مواد التعقيم سواء كانت قاتلة أم مثبطة لنمو البكتيريا بما يلي:

- تخريب البروتين الخلوي عن طريق تخثيره.
- إحداث خلل في نفوذية جدر الخلايا البكتيرية.

– تثبيط عمل المجاميع البروتينية الحيوية داخل الخلية عن طريق الاتحاد بها مثل مجموعات الأميد والأندول والفينول و المجموعات الأمينية.

أ– أهم المعقمات التي تخثر البروتين الخلوي:

- الحموض:مثل حمض البوريك و يستخدم بتركيز (١-٢%)، و بعض الحموض العضوية مثل حمض الخليك و حمض الستريك اللذان يستخدمان كمواد حافظة للأغذية المعلبة.
- القلويات:مثل الصودا الكاوية و تُستخدم بتركيز (٢-٥%) في تعقيم الحظائر، و كذلك البوتاس الكاوي.
- الكحولات: أهمها الكحول الإيتيلي و يستخدم بتركيز ٧٠% و هو بهذا التركيز أكثر فتكاً من التركيز المطلق ١٠٠% و لهذا يُعتبر حفظ الأدوات المعقمة أو تعقيم الأدوات الجراحية و غيرها بالكحول الإيتيلي المطلق خطأً شائعاً. كما يستخدم الكحول الإيتيلي في تعقيم الأيدي و طاولة العمل في مخابر الأحياء الدقيقة.

ب– أهم المعقمات التي تحدث خللاً في نفوذية أغلفة الخلية البكتيرية:

الفينول أو حمض الكربوليك Phenol or carbolicacid:و هو من المواد ذات التأثير القاتل على خلايا الكائنات الحية الدقيقة. يُستخدم بتركيز ٢% خلال ٢٠ دقيقة وهناك بعض مشتقات الفينول مثل: الكريزول Cresol، الكلوروفينول Chlorophenol، الليزول Lysol و هذا الأخير يستخدم على نطاق واسع في تعقيم الأجهزة و الأدوات الطبية و هو مزيج من الكريزول مع الصابون.

ج – أهم المعقمات التي تتحد مع مجاميع البروتين الحيوية:

١– الهالوجينات Halogenes و من أهمها:

- الفلور Fluor و هو قاتل جيد للبكتيريا، لكنه قليل الاستعمال بسبب سميته الشديدة.

- الكلور Chlore و هو يقتل البكتيريا بفعل الأكسدة أو بالاتحاد مع البروتين الخلوي للبكتيريا، و يؤثر على كافة أنواع البكتيريا بتراكيز منخفضة، يستخدم في تعقيم مياه الشرب بمعدل ١ ملغ من غاز الكلور الفعّال لكل ١ ليتر ماء.
- اليود Iode: يحضر على شكل صبغة اليود أو محلول لوغول أو بشكل يودوفورم و يستخدم في تعقيم (تطهير) الجروح.

٢- الأملاح: تمتلك الأملاح المعدنية تأثيراً قاتلاً على البكتيريا و خاصة سالبة الغرام حيث تتشرد في الوسط المائي و تدخل خلايا الكائن الحي الدقيق و تتحد مع مجموعة السلفوهدريل SH- الفعالة في الأنزيمات مما يؤدي إلى تعطيل عمل الأنزيمات مسبباً موت الخلية ومن أشهرها:

- كلوريد الزئبق $Hgcl_2$ (السليماني) و يستخدم بتركيز ١.٠% في تعقيم الأجزاء النباتية سطحياً عند عزل المسببات المرضية الداخلية.
- نترات الفضة $AgNO_3$ و هي قليلة الاستخدام لغلاء ثمنها.
- برمنغنات البوتاسيوم و تستخدم لتطهير الأيدي و الخضراوات بتركيز ١.٠% أو ١.٠٠٠%.

٣- الفورم ألدهيد: و هو غاز ذواب في الماء، و حين يوجد على شكل محلول بتركيز ٣٧% في الماء يطلق عليه الفورمالين أو الفورمول. يستخدم في تطهير مخابر الأحياء الدقيقة بتركيز ٥-١٠%.

٤- الصبغات (الملونات): لبعض الصبغات مثل بنفسجية الجنسيان، أزرق الميتيل، الفوكسين أخضر الملاكيت، تأثيراً قاتلاً أو مثبطاً حسب تركيزها في الوسط و حسب نوع الكائنات الحية الدقيقة المتعرضة لها، و بذلك فهي تفيد في تحضير أوساط مغذية اصطفائية لتنمية البكتيريا سالبة الغرام دون الموجبة لغرام أو العكس فبنفسجية الميتيل مثلاً تُستخدم بتركيز ١-٥ جزء بالمليون في تثبيط نمو البكتريا موجبة الغرام و بتركيز $\frac{1}{10,000}$ لتثبط نمو البكتريا سالبة الغرام.

ثالثاً التعقيم الحيوي:

يستخدم لهذا الغرض الصّادات (المضادات) الحيوية Antibiotics و هي مواد كيماوية تنتج في الطبيعة من أحياء دقيقة معينة لتؤثر على أحياء دقيقة أخرى مثل: البنسلين، الستربتومايسين، التتراسكلين، كلورومفينكول... وغيرها.

تُحدث هذه المواد تأثيرات مختلفة في خلايا الكائنات الحية الدقيقة منها:

- منع تكوين الجدار الخلوي للبكتريا.
- منع تصنيع البروتينات و الأحماض النووية.
- تخريب طبيعة و وظيفة الغشاء السيتوبلاسمي.

الفصل الثَّالث
الأوســـاطُ المغـذيَّـــة

تعجّ البيئة التي نعيش فيها (الماء، الهواء، التربة، ...) بأعداد هائلة من مختلف أنواع الكائنات الحية الدقيقة. و لدراسة هذه الكائنات كان لا بد من توفر بيئات خاصة تمكننا من تنمية و عزل و تصنيف مختلف هذه الأنواع.

تتم تنمية الكائنات الحية الدقيقة في المختبر على مواد مغذية تسمى الأوساط المغذية Culture media (مفردها medium – وسط) التي توفر الاحتياجات الغذائية و الشروط الفيزيائية اللازمة لنمو هذه الكائنات. و للأوساط المغذية أهمية في:

- تنمية و عزل و حفظ الكائنات الحية الدقيقة .
- دراسة الخواص المورفولوجية و الفيزيولوجية للكائنات الحية الدقيقة.
- الحصول على المنتجات الاستقلابية للكائنات الحية الدقيقة مثل الفيتامينات و المضادات الحيوية و المواد السامة ... و غيرها.

أنواع الأوساط المغذية :

يمكن تصنيف الأوساط المغذية وفق عدة معايير :

١- حسب قوامها :

١-١- الأوساط السائلة Liquid media :

مثل وسط المرق المغذي Nutrient broth و مرق الغلوكوز Glucose broth والحليب منزوع الدسم Litmus milk و غيرها ؛ حيث لا يوجد أي مادة مصلّبة تدخل في تركيب هذه الأوساط.

تستخدم هذه الأوساط في تنمية و إكثار العديد من الكائنات الحية الدقيقة و كذلك في دراسات التخمر Fermentation، كما تستخدم عند دراسة تأثير زيادة أو نقص أحد العناصر على نمو الكائن الحي الدقيق و ذلك عن طريق التحكم بتركيز المواد الداخلة في تركيب الوسط المغذي، كما تستخدم الأوساط السائلة عند الحصول على

الفيتامينات و الأنزيمات التي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة. لكن يعاب على هذه الأوساط صعوبة نقلها.

١-٢- الأوساط الصلبة Solid media :

و هي أوساط أضيف إليها مواد مصلّبة Solidifying agents، و من أمثلتها وسط الآجار المغذي Nutrient agar ووسط آجار الدم Blood agar ووسط بطاطا دكستروز آجار PDA ... و غيرها.

تستخدم هذه الأوساط في دراسة الصفات المورفولوجية لمستعمرات الكائنات الحيّة الدقيقة، كما تستخدم في عزل الأنواع البكتيرية أو الفطرية من مزرعة مختلطة (كما سيرد معنا لاحقاً).

*** المواد المصلّبة :**

يستخدم في تصليب الأوساط السائلة مواد عديدة أهمها :

أ- الآجار Agar: وهي مادة كربوهدراتية تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء التي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان، تُضاف إلى الوسط المغذي بمعدل ١.٥-٢%. يمتاز الآجار بعدم تأثره بدرجات حرارة التعقيم (١٢١ م) و يعتبر من أفضل المواد المصلّبة نظراً لتصلّبه عند درجة حرارة المختبر حيث يتصلب بدرجة (٤٢-٤٥ م) و يمكن أن يعود سائلاً مرة ثانية عند تعريضه لدرجة (٩٨ م)، كما تنبع أهميته من عدم مهاجمة معظم الكائنات الحية الدقيقة له. أي أن الوسط الحاوي على الآجار لا يتخرب بفعل معظم الكائنات المنماة عليه.

ب- الجلاتين Gelatin: كان الجيلاتين أول مادة مصلّبة استُعملت في تحضير الأوساط الصلبة، و هو عبارة عن مادة بروتينية تُحَضَّر بمعاملة عظام الحيوانات بحمض كلور الماء HCl و استخلاص الكولاجين Collagen الذي يتحول إلى هلام بمعاملته بالماء المغلي. يضاف إلى الوسط المغذي بمعدل ١٠-١٥%. يتصلب الجلاتين عند درجة حرارة ١٦ م و يسيل عند الدرجة ٣٠-٣٥ م.

و إذا تعرض الجلاتين لدرجة الغليان فإنه ينصهر و لا يتصلب مرة أخرى و لذلك فالأوساط الحاوية عليه لا تعقم بالصاد الموصد عند ١٢١ْ م، و لما كان الجلاتين مادة بروتينية غنية فإن العديد من الأنواع البكتيرية يمكن أن تهاجمه و تحلله لذلك يندر استعماله حالياً كمادة مصلبة للأوساط المغذية و يقتصر استخدامه على دراسة قدرة البكتيريا على إفراز أنزيمات محللة للبروتين مثل أنزيم الجلاتيناز.

جـ- السيلكا Silica gel: و هي مادة تتكون من حمض السلسليك Silicic acid الذي يتخذ قواماً هلامياً على درجة حرارة المخبر، و لكنه عندما يتصلب لا يمكن إسالته ثانيةً. و يمتاز بقلة مهاجمة الكائنات الحية الدقيقة له.

١-٣- الأوساط نصف الصلبة Semisolid media :

و هي تقع بين الأوساط الصلبة و السائلة من حيث القوام، يضاف إليها الآجار بنسبة ٠.١-٠.٢% ممّا يجعل الوسط هلامياً رجراجاً.

٢- حسب تركيبها :

٢-١- أوساط تركيبية Synthetic media :

تتكون هذه الأوساط من مواد ذات تركيب كيميائي محدد و معروف و على درجة عالية من النقاوة، مثل هذه الأوساط قد تباع في الأسواق على صورة مسحوق يضاف إليه في المختبر نسبة محددة من الماء المقطر، و نظراً لدقة تركيبها فإنها تستخدم على نطاق واسع في الدراسات و الأبحاث المتعلقة بدراسة التبادل الغذائي و تحديد الاحتياجات الغذائية للكائنات الحية الدقيقة.

٢-٢- أوساط غير تركيبية Nonsynthetic media : وقد تسمى بالأوساط الطبيعيّة

يدخل في مكونات هذه الأوساط منتجات ذوات أصل نباتي أو حيواني و هي بالتالي تتكون من مواد تركيبها الكيميائي غير معروف على وجه الدقة، مثل وسط المرق المغذي الذي يدخل في تركيبه البيتون و مستخلص اللحم اللّذين يختلف تركيبهما

الكيميائي حسب المصادر الطبيعية التي استخلصت منها، و لذلك فمن الصعب تكرار تحضير مثل هذه الأوساط بنفس الدقة في كل مرة.

تستخدم هذه الأوساط في تنمية الكائنات الحية الدقيقة للحصول على منتجاتها الاستقلابية مثل الفيتامينات و الصادات الحيوية و الأحماض الأمينية و غيرها.

و لما كانت هذه الأوساط ذوات تركيب معقد و غير محدد و متغير باستمرار فإنها تعتبر غير مناسبة لدراسة فيزيولوجيا التبادل الغذائي، لأنه من المتعذر حساب مقدار ما استهلكته الكائنات الدقيقة من العناصر من جهة و معرفة أي المواد التي كوّنتها الكائنات الدقيقة من جهة أخرى.

٢-٣- أوساط شبه تركيبية Semicynthetic media :

و هي التي تحوي على مكونات ذوات تركيب كيميائي محدد و معروف بدقة و مكونات أخرى غير معروفة التركيب بدقة (أي مكونات طبيعية).

٣- حسب الهدف من استخدامها :

٣-١- أوساط انتخابية Selective media :

و هي أوساط يتم تركيبها بطريقة تشجع نمو كائنات حية معينة و تثبط نمو كائنات حية أخرى غير مرغوبة، و ذلك عبر إضافة عناصر غذائية خاصة تسمح بنمو النوع المرغوب تنميته دون غيره. أو إضافة مثبطات نمو تؤثر على بعض الأنواع دون الأخرى. مثل إضافة كلوريد الصوديوم NaCl، أو الحموض، أو بعض الصبغات مثل صبغة الكريستال البنفسجي أو المضادات الحيوية مثل الستربتومايسين أو أي مادة أخرى يمكنها إعاقة نمو الكائنات غير المرغوب بتنميتها.

٣-٢- أوساط تفريقية Differential media :

و هي أوساط تحتوي على مكونات تعمل على إظهار بعض البكتيريا بمظهر مختلف عن الأنواع الأخرى بحيث تسمح بتمييز بعض الأنواع عن الأخرى.

و هناك أوساط مغذية تمتلك خاصيتي الاختيارية و التفريقية معاً مثال ذلك وسط آجار إيوزين زرقة الميثيلين EMB الذي يُستخدم للكشف عن وجود الـ Coliforms في اختبارات المياه (سيرد ذكرها بالتفصيل لاحقاً).

مراحل تجهيز الوسط المغذي :

كانت عملية تحضير الوسط المغذي في الماضي تتطلب جهداً و وقتاً كبيرين، حيث كان على الباحث تجهيز المواد الأولية لتحضير الوسط بنفسه كأن يحضّر مستخلص اللحم أو مستخلص الخميرة و غيرها من المواد. (انظر نهاية الفصل).

أما في الوقت الحاضر فيوجد في الأسواق الكثير من أنواع الأوساط المغذية بصورة جافة Dehydrated مما يسهّل عملية تحضير الأوساط المغذية.

تتم عملية تجهيز الوسط المغذي على النحو التالي:

١. **توزن** المادة الجافة اللازمة لتحضير الكمية المطلوبة من الوسط المغذي بواسطة ميزان حساس.
٢. لتحضير الأوساط **السائلة** يتم إذابة المواد الجافة في كمية مناسبة من الماء المقطر، أما إذا كان الوسط المغذي صلباً (يحتوي على الآجار) فيجب تسخين المزيج (الوسط المغذي + الآجار) على مصباح غازي أو في حمام مائي حتى درجة الغليان مع التحريك المستمر، و هنا يجب مراعاة الفاقد من الماء أثناء عملية الغليان و يتم ذلك بوضع تأشيرة بواسطة قلم يكتب على الزجاج على الجدار الخارجي للكأس تشير إلى مستوى البيئة قبل الغليان ليتم تعويض الفاقد من الماء بعد الغليان حتى مستوى التأشيرة السابقة.
٣. عند تحضير الأوساط **الصلبة** يجب الانتباه إلى عدم انخفاض درجة حرارة الوسط دون ٤٥ م كي لا يتصلب الوسط قبل ضبط درجة حموضته و تفريغه في الأواني الخاصة بذلك و يستعان على ذلك بالحمام المائي.
٤. يتم **ضبط حموضة الوسط** بواسطة جهاز قياس الحموضة pH-meter أو بواسطة ورق عباد الشمس، و لرفع قيم الحموضة أو خفضها يستعان بمحاليل

قياسية لكل من ماءات الصوديوم NaOH (1N ، 0.1N) أو حمض كلور الماء HCl (1N ، 0.1N). و تتم العملية بإضافة بضع نقاط من أحد المحلولين حسب قيمة pH الوسط المرغوبة مع التحريك المستمر للوسط المغذي و القياس المستمر لقيم pH الوسط.

٥. **تعبئة الوسط** في أنابيب اختبار، و يستخدم لذلك نوعان من الأنابيب أقطارها (٢٠ أو ١٦) ملم و طولها ١٥سم حيث تُستخدم الأنابيب الكبيرة لملئها بالوسط الذي سيستخدم لاحقاً في صب الأطباق. في حين تُستخدم الأنابيب الصغيرة لتحضير الآجار المائل أو العميق أو لملأ الأوساط المغذية السائلة. ويجب أن تكون الأنابيب نظيفة و مغسولة بالماء العادي ثم المقطر بواسطة فرشاة خاصة مع مراعاة عدم تجفيف الأنابيب بالمنشفة و إنما تركها لتجف بالهواء.

يتم ملء الأنابيب بالوسط المغذي بواسطة جهاز مُعاير لتصريف كمية محددة من السائل أو بواسطة قمع يثبت على حامل معدني. و لضمان تساوي كمية الوسط المغذي في جميع الأنابيب نلجأ إلى ملء أحد الأنابيب بكمية محددة تمّ قياسها بواسطة سلندر أو ماصة و يسمى هذا الأنبوب بالأنبوب المرشد Guide tube الذي يُسْتعان به عند صب باقي الأنابيب و ذلك بمسكه إلى جوار الأنبوب المراد ملؤه بالوسط المغذي ثم تعبئة الوسط في الأنبوب الفارغ إلى ذات المستوى في الأنبوب المرشد.

إذا كان الوسط مجهّزاً لدراسة التخمرات (وهذا يتم في الأوساط السائلة) نلجأ إلى إضافة أنابيب صغيرة مفتوحة النهاية تدعى أنابيب دورهام إلى أنابيب الاختبار التي تحوي الوسط المغذي السائل.

بعد ملء أنابيب الاختبار بالوسط المغذي يتم **تغطيتها** بسدادات مصنوعة من القطن المرصوص و المغطى بالشاش الذي يحول دون دخول الكائنات الحية الدقيقة إلى داخل الأنابيب.

٦. **التعقيم Sterilization**: يتم التعقيم بعد الانتهاء من تعبئة الوسط المغذي في أنابيب الاختبار مباشرة لأن الأحياء الدقيقة الموجودة في مكونات البيئة الجافة أو في الماء المقطر المستخدم في تحضير الوسط المغذي أو الموجودة على الجدران الداخلية لأنابيب الاختبار يمكن أن تهاجم الوسط المغذي و تخربه خلال فترة قصيرة.

تُعقم الأوساط المغذية عادة في الأوتوغلاف على درجة حرارة ١٢١ م مدة ١٥ دقيقة و في بعض الحالات يتم التعقيم بالترشيح أو في جهاز آرلوند حسب الخواص الفيزيائية و الكيميائية للمواد الداخلة في تركيبها. (راجع فصل التعقيم).

أمثلة عن بعض الأوساط المغذية و طريقة تحضيرها:

- **وسط الآجار المغذي Nutrient Agar:**

يقطع ٥٠٠ غ من اللحم البقري الطازج و الخالي من العظام و الدهن إرباً إرباً، و يوضع في وعاء يضاف إليه ليتر ماء، و يسخن حتى (٥٠°) م. ثم يمرر المستخلص من خلال طبقة قطنية مغلفة بالشاش. و يغلى الراشح لمدة (٣٠) دقيقة و يرشح مرتين.

الأولى: من خلال القطن و الشاش.

الثانية: خلال ورقة الترشيح.

ثم يكمّل حجم الراشح بالماء حتى ليتر واحد. و يصب في حوجلات مزودة بغطاء قطني و يعقم بالصاد الموصد عند (١٢١° م) لمدة (٢٠) دقيقة، فنكون بذلك قد حصلنا على ما يسمى وسط مرق اللحم (المرق المغذي) Bouillon or Nutrient broth. و للحصول على وسط المرق المغذي بمواصفات جيدة يمكن إضافة الببسين مع تحميض الوسط بحمض كلور الماء، حيث يتم حلمهة المركبات البروتينية للحم و بالتالي تزداد كمية المواد المغذية. و يمكن الاستعاضة عن مرق اللحم بما يسمى بمستخلص اللحم البقري Beef extract الذي يضاف بمعدل (٥) غ لكل (١) ليتر. و عند إضافة الببتون (الهضمون) بمعدل (٥-١٠) غ/ليتر و (١٥-٢٠) غ/ليتر آجار، بعد إذابته في حمام عند (١٠٠°) م و ضبط pH الوسط لتصبح متعادلة، فنكون بذلك قد حصلنا على وسط

الآجار المغذي Nutrient Agar الذي يُعقم بالأوتوكلاف عند (١٢١°) م لمدة (٢٠) دقيقة.

- **وسط آجار البطاطا Potato Agar:**

يضاف إلى (٢٠٠ غ) من البطاطا المقشورة و المقطعة، ليتر من الماء، و يغلى لمدة ٣٠ دقيقة. يصفى المزيج عبر طبقة قطنية، و يكمل الراشح إلى الليتر و يضاف (٢)% آجار مع التسخين المستمر حتى الذوبان. تضبط pH الوسط ليصبح معتدلاً. يعقم الوسط بالصاد الموصد عند (١٢١°م) لمدة (٢٠) دقيقة.

- **وسط مستخلص من الخميرة Yeast extract:**

يمدد كغ واحد من الخميرة المضغوطة في ليتر من الماء، ويغلى الخليط لمدة ساعة واحدة و يرشح ثلاث مرات من خلال ورق الترشيح و يعقم عند (١١٥° م) لمدة (٣٠) دقيقة. يعدّ هذا الوسط غنياً جداً بالفيتامينات كما يحتوي على آزوت عضوي و مركبات كربونية.

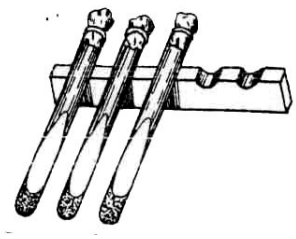
- **مغلي البقوليات (الفاصولياء):**

يضاف إلى (٥٠) غ من الفاصولياء ليتر واحد من الماء. و يغلى المزيج حتى تنضج الفاصولياء (ولكن بدون أن تتفكك الحبوب). يرشح ماء الغلي خلال القطن المغلّف بالشاش. و يضاف إلى الراشح (١٠) غ من السكروز، و يكمل حجمه حتى واحد ليتر. يضبط pH الوسط ليصبح متعادلاً، و يصب في حوجلات و يعقم بالأوتوكلاف عند (١١٥° م) لمدة (٣٠) دقيقة.

طريقة تجهيز الآجار المائل Slants agar:

بعد انتهاء التعقيم مباشرة توضع أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط المغذي الصلب و هو مازال مائعاً بشكل مائل (زاوية ٢٠°) و يجب الانتباه إلى عدم تبليل الأغطية القطنية التي تسد الأنابيب، ثم تُترك الأنابيب ليتصلب الوسط المغذي بداخلها.

و بذلك نحصل على الآجار المائل الذي يستخدم في تنمية و عزل و حفظ الكائنات الحية الدقيقة مؤمناً سطحاً أوسعاً لنموها. (الشكل-١٥)



(الشكل- ١٥) طريقة تجهيز الآجار

طريقة تجهيز الآجار العميق Deeps agar :

توضع أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط المغذي على حامل أنابيب الاختبار بشكل عمودي و الوسط المغذي لا يزال بَعْدُ مائعاً و يُتْرك ليبرد الوسط المغذي و يتصلب داخل الأنابيب بصورة عمودية.

يستخدم الآجار العميق لأغراض زرع البكتريا بطريقة الوخز و ذلك لتحديد علاقة الكائن الحي بالأكسجين.أما الأنابيب المحتوية على وسط مغذٍ و التي لا تستخدم مباشرةً في عمليات الزرع أو العزل فيمكن أن تحفظ في البراد لعدة شهور دون أن تتخرب.

الفصل الرَّابع
تَنميةُ و عزلُ الأحياءِ الدَّقيقة

مقدمة و تعاريف :

عند دراسة الكائنات الحية الدقيقة في الأوساط المختلفة (التربة، الماء، الغذاء،...) يلاحظ أن هذه الكائنات توجد على شكل تجمعات مختلطة تضم أنواعاً مختلفة. و لكي يتسنّى دراسة الخواص الشكلية (المجهرية) و الفيزيولوجية وحتى المزرعية (أثناء نموها على أو في الأوساط المختلفة) لابد من الحصول عليها بصورة منفردة.

تسمى العملية التي يتم فيها تنمية الأحياء الدقيقة على أو في الأوساط المغذية بالاستنبات أو الاستزراع. والأحياء الدقيقة النامية بالمستنبتات أو المزارع Cultures.

عند نمو الكائنات الدقيقة في أوساط مغذية سائلة، تشكل معلّقاً أو راسباً أو غشاءً. بينما تشكل مستعمرات عند نموها على أوساط غذائية صلبة.

المستنبتات أو المزارع إما أن: تحتوي على خلايا تتبع لنوع واحد، و تسمى **بالمزارع النقية Pure culture** أو تحتوي على خلايا تتبع لأنواع مختلفة، و تسمى عندها **بالمزارع المختلطة Mixed culture**.

تدعى العملية التي يتم فيها نقل مزارع الكائنات الدقيقة من وسطٍ مغذٍ، إلى آخر **بإعادة الزرع**.

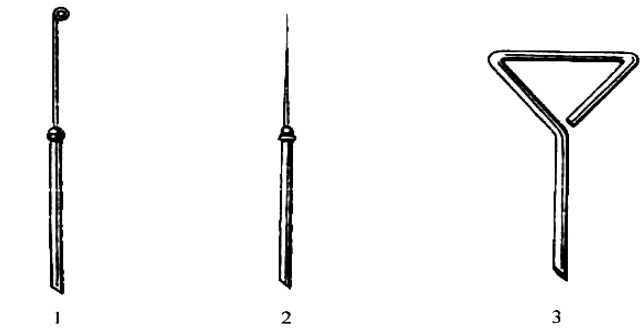
تنمى الأحياء الدقيقة عند درجات حرارة معينة. و تسمى العملية التي يتم فيها تنمية الأحياء الدقيقة عند درجات حرارة معينة **بالتحضين Incubation** و تجرى عادة في جهاز يدعى الحاضنة.

يجرى تنمية الأحياء الدقيقة على الأغلب في أوعية زجاجية: كأنابيب الاختبار و الحوجلات وفي أطباق بتري.

يتم تنمية الأحياء الدقيقة في أنابيب الاختبار الحاوية على أوساط مغذية صلبة أو سائلة. و الأخيرة تُعبأ بحيث تحتل $\frac{1}{3}$ أنبوب الاختبار، في حال كانت الأحياء الدقيقة المنوي تنميتها هوائية، بينما يجب أن تحتل أكثر من $\frac{2}{3}$ أنبوب الاختبار، بالنسبة للأحياء الدقيقة اللاهوائية.

كما يمكن أن تنمّى الأحياء الدقيقة في أنابيب الاختبار، المحتوية على أوساط مغذية صلبة، بعد تجهيز الآجار المائل أو العميق.

يجري تنمية الأحياء الدقيقة في أطباق بتري حاوية على أوساط مغذية صلبة حصراً. يُستخدم عند إجراء عمليات الزرع و عزل الأحياء الدقيقة، الإبر اللاقحة Needle Inoculating و هي إما أن تكون ذات نهاية حلقية، و تسمى بالإبرة ذات العقدة، أو نهاية مستقيمة (مدببة). كما و تستخدم الماسحات التي تؤمن توزيع المادة المراد زرعها على الأوساط الصلبة بشكلٍ متساوٍ. (الشكل-١٦)

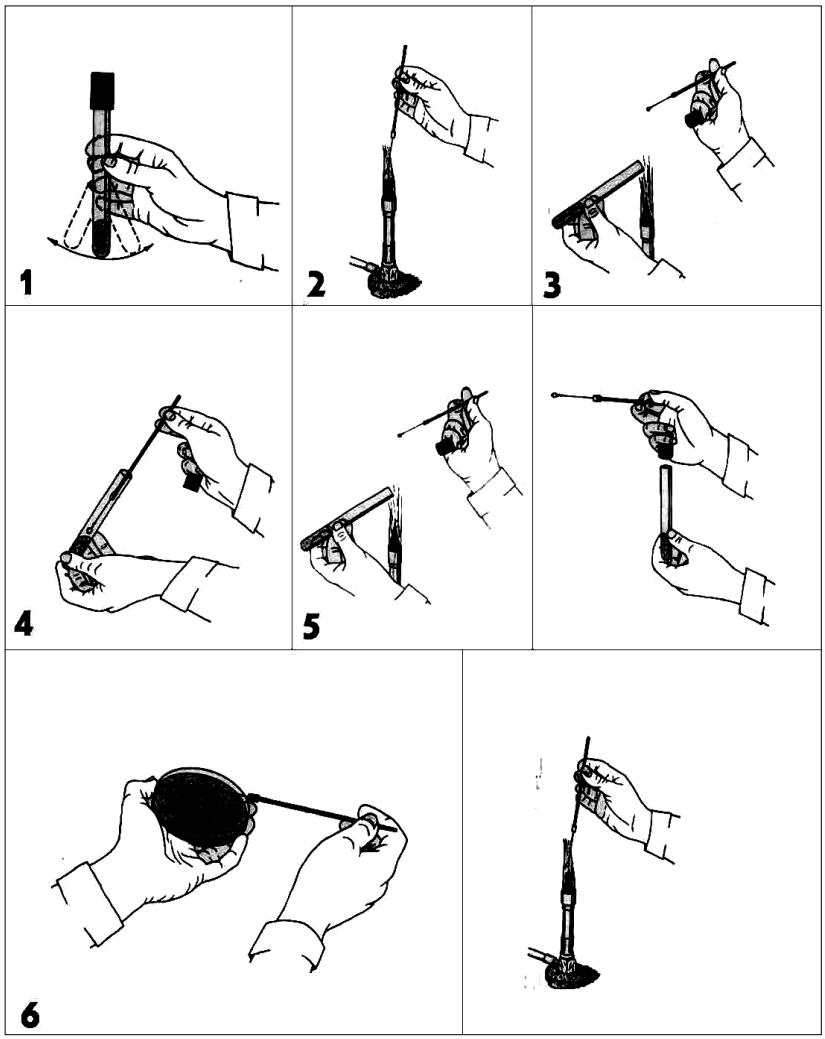


(الشكل-١٦)

تجرى عمليات الزرع و عزل الأحياء الدقيقة في ظروف معقمة (عقيمة)، إما قرب اللهب، أو في غرف خاصة تسمى غرف العزل Isolation Cabinet.

طرائق زرع الكائنات الحية الدقيقة

أ- في حال كانت الأحياء الدقيقة موجودة (أو منماة) في وسط مغذٍّ سائل (أو في سائل ما): مثل: معلّق التربة، حليب، عصائر....الخ فيتم إجراء عملية الزرع على النحو التالي: (الشكل-١٧)



(الشكل-١٧) مراحل زرع الأحياء الدقيقة الموجودة في وسط سائل على أوساط صلبة

١- يرج الوعاء (أنبوب اختبار) الموجودة فيه المزرعة بشكل جيد.

٢- يتم أخذ العينة إما بواسطة الإبرة اللاقحة، أو بواسطة ممص معقم، في الحالة الأولى ينبغي تعقيم الإبرة بالتلهيب ثم يُنتظر حتى تبرد. أما في الحالة الثانية، فيؤخذ الممص المعقم على عجل من اللفافة الورقية من الجهة غير المدببة للمص (انظر طريقة تحضير الأدوات الزجاجية للتعقيم).

٣- يُفتح الغطاء القطني لأنبوب الاختبار بواسطة خنصر و راحة اليد اليمنى، التي تحمل إما الإبرة اللاقحة أو الممص المعقم. و تعقم فوهة الأنبوب على اللهب.

٤- تدخل الإبرة اللاقحة أو الممص في أنبوب اختبار و تؤخذ العينة بحيث لا تلامس جدار الأنبوب عند خروجها منه.

٥- تلهب فوهة أنبوب الاختبار، و يمرر الغطاء القطني على اللهب بسرعة، و يتم سد أنبوب الاختبار.

٦- توضع العينة المراد زرعها في طبق بتري يحوي على وسطٍ مغذٍ مناسب، و في حال استخدمت الإبرة اللاقحة عند أخذ العينة، تمرر الأخيرة على كامل الطبق بحيث يتم توزيع العينة بشكل متجانس. ثم تعقم الإبرة اللاقحة باللهب. أما في حال أخذت العينة بالممص؛ فيتم نشرها على كامل السطح بواسطة الإبرة اللاقحة أو بواسطة الماسحة (الناشر) الزجاجية، و الأخيرة أفضل لأنها سهلة الانزلاق على الوسط و تكفل توزيعاً متجانساً للعينة المدروسة على كامل الطبق.

٧- توضع أطباق بتري المزروعة بالحاضنة بشكل مقلوب عند درجة حرارة مناسبة. و بعد عدة أيام يلاحظ نمو المستعمرات.

ملاحظات:

١- إن طريقة تحضير العينة للزرع تختلف حسب المادة المدروسة.

٢- إذا كان من المتوقع أن تحوي المادة المدروسة على أعداد كثيرة من الأحياء الدقيقة فيمكن اتباع طريقة التخفيفات المتتالية (انظر طرائق تحديد تعداد الكائنات الدقيقة). ثم يُختار التخفيف المناسب الذي تؤخذ منه العينة ليتم زرعها بالطريقة آنفة الذكر.

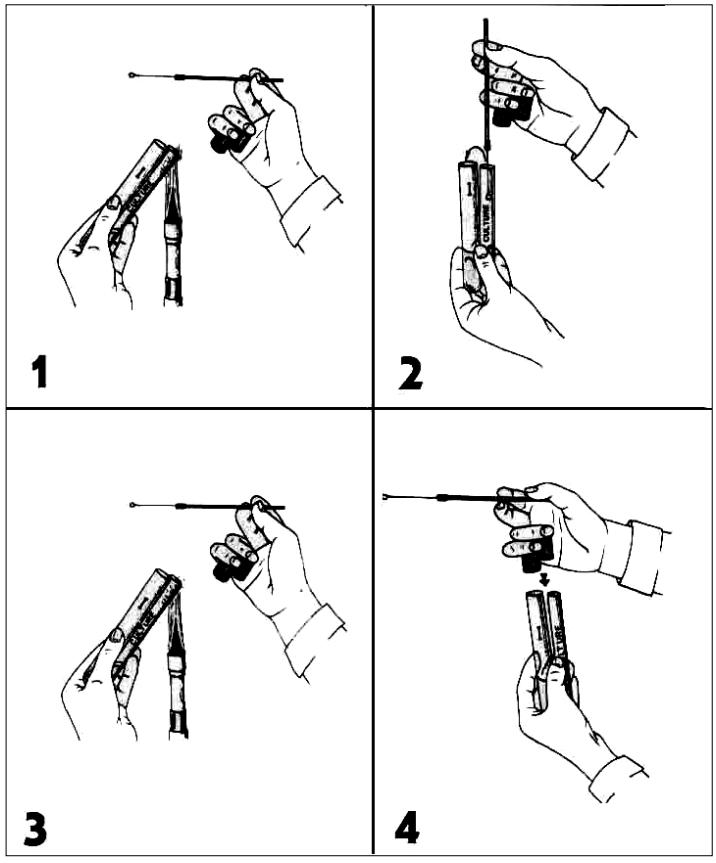
ب- في حال كانت الأحياء الدقيقة منماة على وسطٍ مغذٍ صلب:

في بعض الأحيان تتطلب الأعمال الميكروبيولوجية نقل مزارع نامية على وسط مغذ صلب إلى وسط مغذ صلب آخر معقم (إعادة الزرع)، و هنا نكون أمام حالتين:

الحالة الأولى: نقل مزارع من أنبوب اختبار الآجار المائل، إلى أنبوب آجار مائل آخر (لا يحتوي على مزارع).

الحالة الثانية: نقل مستعمرات نامية على أطباق بتري، إلى أنبوب الآجار المائل (لا يحتوي على مزارع).

في الحالة الأولى تتم عملية النقل على النحو التالي: (الشكل-١٨)



(الشكل-١٨) مراحل نقل مزارع من أنبوب آجار مائل إلى أنبوب آجار مائل (لا يحوي مزارع)

١- يوضع كلا الأنبوبين في اليد اليسرى بوضع مائل قرب اللهب، و يزال الغطاء القطني لأنبوب الاختبار الأول بواسطة وسطى و بنصر اليد اليمنى، كما و يزال الغطاء

القطني لأنبوب الاختبار الثاني بواسطة خنصر و راحة اليد اليمنى، التي تحتوي أيضاً على الإبرة اللاقحة المعقمة و الممسوكة بين السبابة و الإبهام.

٢- تعقم فوهتا أنبوب الاختبار على اللهب، و تدخل الإبرة اللاقحة المعقمة إلى أنبوب الاختبار، الذي يحوي المزارع البكتيرية. و يؤخذ بواسطة الإبرة كمية من الكتلة البكتيرية و تدخل على عجل إلى أسفل أنبوب الآجار المائل. و تمرر على سطح الآجار بحركة متموجة، ثم تسحب الإبرة اللاقحة. و يراعى عند إدخال و إخراج الإبرة اللاقحة أن لا تمس سطح أنبوب الاختبار. ثم تعقم الإبرة اللاقحة بالتلهيب.

٣- تلهب فوهتا أنبوبي الاختبار، و كذلك السدادتان القطنيتان، و تسد فوهتا الأنبوبين.

٤- يتم تحضين الأنابيب المزروعة عند درجة حرارة مناسبة.

ملاحظة:

يمكن أن يجد الطالب في البداية صعوبة في إجراء الطريقة. و لكن ستزول الصعوبة هذه بعد التدريب.

في الحالة الثانية: أي عند نقل مستعمرات نامية على أطباق بتري إلى أنبوب الآجار المائل (لا يحتوي على مزارع) فإن عملية نقل الأحياء الدقيقة تجري على النحو التالي:

١- تعقم الإبرة اللاقحة بالتلهيب و تبرد.

٢- يوضع طبق بتري على راحة اليد اليسرى، و يفتح فتحة بسيطة بالقرب من اللهب بواسطة الإبهام، ثم تدخل الإبرة اللاقحة في الطبق (يمكن تبريد الإبرة اللاقحة التي عُقمت للتو إما على السطح الداخلي لغطاء الطبق، أو بغمسها في الوسط المغذي في منطقة بعيدة عن النمو الميكروبي).

٣- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة، جزء من المستعمرة المختارة أو كلها (في حال كانت المستعمرة صغيرة).

٤- يغلق الطبق و يوضع جانباً. ثم يمسك أنبوب الآجار المائل باليد وتعقم فوهة الأنبوب باللهب ثم تدخل الإبرة إلى أسفل الأنبوب و توزّع العينة بحركة زكزاكية

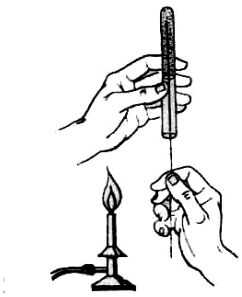
على سطح الآجار المائل. و يراعى عند إدخال الإبرة، أو إخراجها أن لا تمس سطح الأنبوب.

٥- تمرر فوهة أنبوب الاختبار و يمرر الغطاء القطني أيضاً على اللهب، و يسد الأنبوب. ثم تعقم الإبرة اللاقحة بالتلهيب. توضع أنابيب الآجار المائل المزروعة في الحاضنة عند حرارة مناسبة.

جـ – الزرع بطريقة الوخز Stab Inoculation:

و يستخدم لذلك الإبرة اللاقحة المستقيمة و كذلك أنبوب اختبار الآجار العميق (الذي يحضر بصب كمية من الوسط تعادل $\frac{1}{3}$ حجمه و يوضع بشكل عامودي حتى يتصلب) تتم الطريقة على النحو التالي: (لشكل-١٩)

١- تعقم الإبرة اللاقحة المستقيمة باللهب، و تُبَرّد، و يؤخذ بواسطتها عينة من الكتلة البكتيرية.



(الشكل-١٩) الزرع بطريقة الوخز

٢- يفتح أنبوب الاختبار الذي يحتوي على الآجار العميق، قرب اللهب و تعقم فوهته.

٣- يتم وخز الإبرة في الوسط المغذي بحيث تكون فوهة أنبوب الاختبار نحو الأسفل.

٤- تعقم فوهة أنبوب الاختبار باللهب، و كذلك الغطاء القطني، و يسد الأنبوب. ثم تعقم الإبرة اللاقحة بالتلهيب.

٥- يحضن أنبوب الاختبار عند درجة حرارة مناسبة.

يمكن أن تستخدم هذه الطريقة لمعرفة علاقة الكائنات الدقيقة بالأكسجين (الأمر الذي سنأتي على ذكره في مقام آخر)..

طرائق عزل البكتيريا

نظراً لوجود البكتيريا في الطبيعة بصورة غير نقية دائماً، و من أجل دراسة خواصها الفيزيولوجية و البيوكيميائية ، و كذلك لتحديد نوعها، يتم عزلها بصورة نقية. و المزارع النقية (كما سلف ذكره) هي تلك المزارع التي تحوي خلايا تتبع لنوع واحد.

للحصول على المزارع النقية يتم إجراء الخطوات المتعاقبة التالية:

١- زرع المادة المراد عزل البكتيريا منها على وسط مغذ يتناسب و الخواص الفيزيوبيوكيميائية للبكتيريا المراد عزلها (الزرع على أوساط انتخابية).

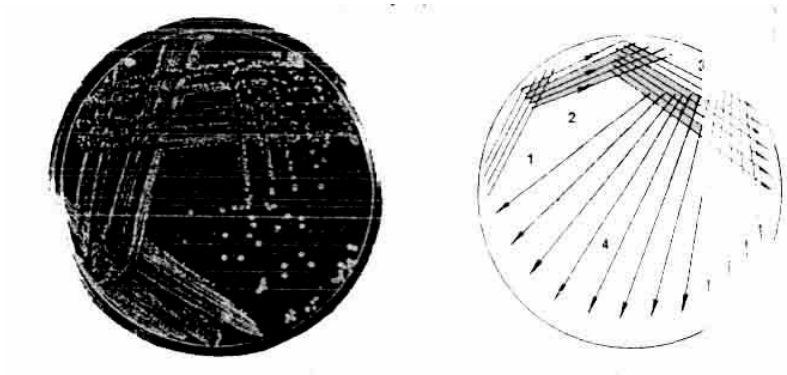
٢- إجراء عملية العزل بالطرائق التي سيأتي شرحها.

٣- إجراء اختبار النقاوة للبكتيريا المعزولة للتأكد من أنها تتبع لنوع واحد.

أ- طريقة الأطباق المخطوطة The Streak – Plate Technique :

١- يقسم طبق بتري الحاوي على وسط مغذٍ (الآجار المغذي مثلاً) إلى عدة أقسام.

٢- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة و المبردة، جزء من المزارع المختلطة و توزع بشكل خطوط في أحد أقسام طبق بتري (الشكل-٢٠).



(الشكل-٢٠) عزل البكتريا بطريقة الأطباق المخطوطة

٣- تعقم الإبرة اللاقحة باللهب و تُبَرّد، ثم تُدخل ثانية إلى طبق بتري، الذي يدوّر قليلاً و يُخطّط القسم الثاني منه بدءاً من نهاية خطوط القسم الأول.

٤- تكرر العملية في مناطق مجاورة أخرى من الطبق حتى يتم مسح كافة الأقسام المحيطة بالطبق. و تبقى المساحة المحيطة بمركز الطبق غير مزروعة.

٥- تزرع المساحة المحيطة بمركز الطبق غير المزروعة سابقاً بعدة خطوط، بدءاً من نهاية خطوط القسم الأخير من الطبق، ثم تعقم الإبرة اللاقحة. يُحضن الطبق مقلوباً عند درجة حرارة مناسبة. يُتوقع بعد عدة أيام من التحضين أن تحتوي المنطقة المحيطة بالمركز على مستعمرات منعزلة (مفردة).

لإجراء اختبار النقاوة يتم اتباع ما يلي:

١- المراقبة (المشاهدة) العينية المباشرة: يراقب عينياً خواص نمو البكتيريا المنعزلة على الأوساط المغذية الصلبة (معرفة الخواص المزرعية) سواء عند نموها على سطح الآجار المائل حيث يجب أن يكون نموها متماثلاً. أو عند نموها على سطح الوسط المغذي في طبق بتري فيجب أن تتشكل مستعمرات ذوات مظهر و لون و قوام متماثل.

٢- الفحص المجهري: يُجهز محضر الخلايا المثبتة و الملونة من إحدى المستعمرات المنفردة، و يصبغ بطريقة غرام، فإذا تبين أن الغشاء يحتوي على خلايا ذات أشكال متماثلة ومصبوغة بلون واحد، اعتبرت المستعمرة نقية و إلا أُعيد إجراء عملية العزل ثانية. و كذلك أُعيد اختبار النقاوة.

ب– طريقة الأطباق المصبوبة The Pour Plate Techniques :

١- يُصهر وسط الآجار المغذي الموجودة في ثلاثة أنابيب اختبار أو أكثر، و ينتظر حتى تنخفض درجة حرارته حتى (٥٠-٦٠) م وترقم أنابيب الاختبار ١،٢،٣... .

٢- تُنقل قطرة واحدة من المزرعة المختلطة بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة و المبردة، إلى أنبوب الاختبار الأول.(الشكل-٢١)

٣- يُرج أنبوب الاختبار الأول بشكل جيد و ذلك بوضعه بين راحتي الكفين.

٤- يُنقل من أنبوب الاختبار الأول بواسطة الإبرة اللاقحة قطرة إلى أنبوب الاختبار الثاني، و يتم رج الأنبوب الثاني بشكل جيد.

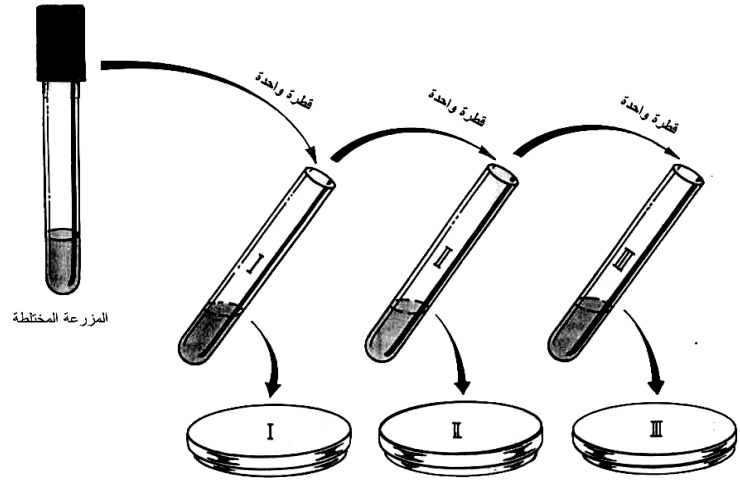
٥- ينقل من أنبوب الاختبار الثاني قطرة إلى أنبوب الاختبار الثالث بواسطة الإبرة اللاقحة. و يتم رَجّ الأنبوب الثالث بشكل جيد. و يتوقف عدد أنابيب الاختبار المستخدمة و عدد القطرات المأخوذة من كل أنبوب اختبار إلى آخر على عدد الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في العينة الابتدائية. و بديهي أنه كلما كان عدد الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في المزرعة (العينة) الابتدائية كبيراً، كانت أنابيب الاختبار المستخدمة لهذه الطريقة أكثر.

٦- تصب محتويات كل أنبوب من أنابيب الاختبار السابقة في طبق بتري معقم و مرقّم بأرقام متوافقة مع أرقام أنابيب الاختبار. تحرك الأطباق المصبوبة، على سطح مستو حركة رحوية لطيفة.

٧- تحضّن أطباق بتري مقلوبة عند درجة حرارة (٣٧ م). فتظهر المستعمرات بعد عدة أيام على سطح الوسط المغذي أو مغموسة في الآجار. ومن المتوقع أن تحوي الأطباق الأخيرة (٢-٣) على مستعمرات منفردة. ثم تجرى عملية اختبار النقاوة بالطريقة المشروحة سابقاً.

ملاحظة:

تعتبر طريقة الأطباق المصبوبة غير ملائمة لعزل البكتيريا المحبة للحرارة المنخفضة Psychrophilic bacteria فسّر ذلك؟.



(الشكل-٢١) مراحل عزل البكتريا بطريقة الأطباق المصبوبة

جـ – طريقة الأطباق المنشورة Spread plate method :

و هي إحدى طرق عزل البكتيريا على الأوساط المغذية الصلبة. و تتم حصراً في أطباق بتري معقمة محتوية على وسط مغذ صلب. و تتلخص الطريقة في :

١- وضع كمية من معلّق البكتيريا السائل على سطح الوسط المغذي بواسطة ممص معقم.

٢- توزيع هذه الكمية على كامل الوسط المغذي الموجود في طبق بتري بواسطة الماسح (أو الناشر) المعقم الذي يؤمن توزيعاً متجانساً للمادة على كامل سطح الوسط المغذي.

٣- بعد التحضين (يتم التحضين و الأطباق مقلوبة) يمكن الحصول على مستعمرات منفردة تجري إعادة زرعها و عزلها بشكل نقي على أوساط صلبة جديدة.

٤- إجراء اختبارات النقاوة.

ء – يمكن عزل خلايا بكتيرية منفردة باستخدام تقنية Micromanipulater Techniques:

حيث توضع آلية معينة على ساحة المجهر، و يتم أخذ الخلية المبتغاة و عزلها بواسطة ممص دقيق Micropipette أو بواسطة إبرة دقيقة Microprobe. على النحو التالي:

١- تنقل قطرة صغيرة من المزرعة البكتيرية المراد دراستها إلى شريحة زجاجية معقمة.

٢- توضع القطرة في وسط حقل الرؤية للمجهر. و بجوار القطرة ينقل بواسطة ماصة معقمة قطرة من وسط مغذ معقم.

٣- تدخل الإبرة الدقيقة Microprobe إلى قطرة المزرعة المراد دراستها، و تؤخذ بواسطة الإبرة الدقيقة خلية واحدة (تتم المراقبة بالمجهر طبعاً) و تنقل إلى الوسط المغذي المجاور، ثم ينقل الأخير بدوره إلى وسط آخر لتنميته (لاستزراعه).

٤- تجرى اختبارات النقاوة بالطريقة المعتادة.

هـ– عزل البكتيريا المتبوّغة:

لما كانت للبكتيريا المتبوغة القدرة على مقاومة تأثير الحرارة المرتفعة، فيمكن استغلال هذه الخاصية من أجل عزلها ذلك باعتبار أن الخلايا الخضرية (الإعاشية)، لا تتحمل الحرارة المرتفعة فتموت. في حين تبقى الأبواغ حيّة.

الطريقة:

١- توضع العينة المراد دراستها في حمام مائي عند (٨٠° م) لمدة (٢٠) دقيقة.

٢- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة و المبردة، عينة، و تزرع على وسط الآجار المغذي.

٣- تحضن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة مناسبة. و بعد عدة أيام تظهر مستعمرات البكتيريا المتبوغة.

٤- يجرى اختبار النقاوة بالطريقة المشروحة آنفاً.

تجدر الإشارة أن هذه الطريقة تتبع أيضاً عند عزل البكتيريا المتبوغة من التربة.

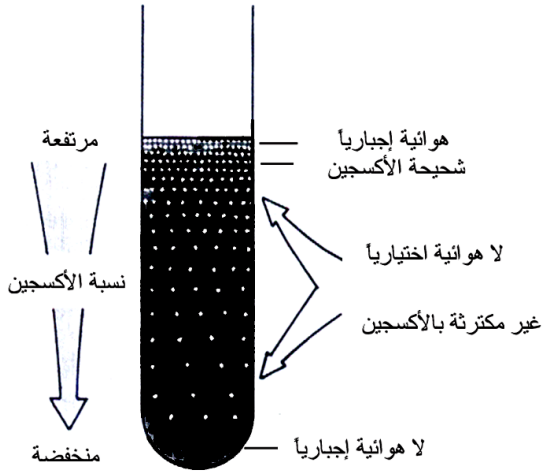
هذا و يمكن عزل البكتيريا بطرائق أخرى مستفيدين من الخواص الفيزيولوجية و البيوكيميائية لها، و ذلك بزراعتها على أوساط مغذية متنوعة. و هذا في الواقع ما يتم عند تحديد أنواع الكائنات الحية الدقيقة (الاختبارات البيوكيميائية). الأمر الذي سنأتي على ذكره في مقام آخر.

و– تنمية و عزل البكتيريا اللاهوائية Cultivation of anaerobes :

إن طرائق العزل السابقة (الأطباق المخطوطة أو المصبوبة أو المنشورة ..) تستخدم عند تنمية الكائن الحي الدقيق بوجود الأوكسجين، بيد أن هناك الكثير من البكتيريا يعد الأوكسجين بالنسبة لها إما ساماً أو مثبطاً لنموها و لذلك تحتاج لنموها إلى توفر شروط لاهوائية Anaerobic environment وذلك باستخدام أوساط مغذية خاصة يغيب عنها الأوكسجين أو يوجد فيها بكميات قليلة. و كذلك بتأمين ظروف محيطة خالية من الأوكسجين.

تختلف الأنواع البكتيرية في حاجتها للأوكسجين فقد تكون البكتيريا هوائية إجبارياً Strict aerobes و هذه الأنواع لا تنمو بدون أوكسجين، أو لا هوائية إجبارياً Strict anaerobes وهذه الأنواع تموت بوجود الأوكسجين، وبين هذين النقيضين من الاحتياجات للأوكسجين توجد أنواع بكتيرية اختيارية Facultatives في حاجتها للأوكسجين، و هذه الأنواع تمتلك نظاماً أنزيمياً يعمل بوجود الأوكسجين أو غيابه بشرط وجود مواد تستعمل كمصدر للأوكسجين مثل النترات، فهي تكيف نفسها حسب الظروف. كما أن هناك أنواعاً غير متأثرة بوجود الأوكسجين أو غيابه Indifferents و

هذه الأنواع تنمو بنفس القدر و الكفاءة بوجود أو غياب الأكسجين عن أوساطها. وهناك مجموعة أخيرة من البكتيريا تحتاج الأكسجين الحرّ بكميات قليلة تدعى شحيحة الأكسجين Microaerophiles (الشكل-٢٢).



(الشكل-٢٢) احتياجات الكائنات الحية الدقيقة للأكسجين

عند تنمية و عزل البكتيريا اللاهوائية يمكن أن تستخدم أوساط صلبة مثل: Tryptone Glucose Yeast Agar (TGYA) و سائلة مثل:
Fluid Thioglycollate Medium (FTM), Brewer's Anaerobic Agar و كل وسط من هذه الأوساط يخدم لتحقيق هدف مختلف:

١- وسط Tryptone Glucose Yeast Agar (TGYA) :

يستخدم هذا الوسط الصلب بطريقة تدعى الأنبوب المهتز Shake tube و هذا الوسط هو بالأساس ليس وسطاً لا هوائياً، بل على العكس فهو يؤمن نمواً جيداً لطيفٍ واسعٍ من البكتيريا. و تتم طريقة تقدير علاقة الكائن الحي الدقيق بالأكسجين عند استخدام هذا الوسط على النحو التالي:

١- يوزع الوسط TGYA في أنابيب اختبار بحيث يحتل الوسط $\frac{2}{3}$ الأنبوب.
٢- يعقم الوسط بالأوتوكلاف عند /١٢١°م لمدة /١٥/ دقيقة.
٣- يُنتظر حتى تصبح درجة حرارة الوسط ٤٥-٥٠°م (قبيل التصلّب).
٤- تُلقح الأنابيب بالنوع البكتيري المدروس بواسطة الإبرة ذات العقدة و ذلك بأخذ كمية مناسبة منه (بعد أن يتم تعقيمها).
٥- تغمس الإبرة اللاقحة في الوسط المغذي.
٦- يُرج أنبوب الاختبار عدة مرات أو يتم دحرجته بين راحتي الكفين.
٧- يُترك أنبوب الاختبار بوضع عمودي عند درجة حرارة المخبر ليتصلب.
٨- تحضّن الأنابيب عند درجة حرارة ومدة زمنية تتوافق و الاحتياجات الفيزيوبيوكيميائية للكائن الحي الدقيق المدروس.
٩- تسجل نتائج علاقة النوع الميكروبي المدروس بالأكسجين و ذلك اعتماداً على مكان حدوث النمو الميكروبي في الأنبوب؛ على السطح (هوائي)، وفي الوسط (اختياري)، وفي قاع الأنبوب (لاهوائي).

٢- وسط Fluid Thioglycollate Medium (FTM) :

يعد هذا الوسط من الأوساط المغذية الغنية و هو يسمح بنمو كل من البكتيريا الهوائية و اللاهوائية.يحوي الوسط على الغلوكوز و السيستين Cystine و ثيوغليكولات الصوديوم Sodium thioglycollate التي تعمل على تقليل كفاءة الوسط التأكسدية الاختزالية Oxidation-reduction (O/R) Potential كما يحوي الوسط على صبغة Resazurin التي تعمل بمثابة مؤشر لوجود الأوكسجين؛ فهي تأخذ اللون القرنفلي Pink عند وجود الأوكسجين و تصبح عديمة اللون عند غياب الأوكسجين؛ و من هنا فإن الوسط المغذي هذا يأخذ لوناً قرنفلياً عند السطح و يتدرج زوال اللون حتى ينعدم في وسط و قاع أنبوب الاختبار. كما يمكن إضافة نسبة قليلة من الآجار الذي يفيد في تثبيت الأحياء الدقيقة المدروسة و يؤمن شروطاً لا هوائية في قاع الأنبوب.

ملاحظة: إذا تجاوز اللون القرنفلي للوسط أكثر من ٣٠% اعتباراً من سطح الوسط باتجاه الأسفل، يجب تعريض الأنبوب للغليان عدة دقائق للتخلص من الأوكسجين.

يتم تقدير علاقة (حاجة) الكائن الحي الدقيق المدروس بالأوكسجين بنفس الطريقة التي ذكرت عند استخدام وسط (TGYA).

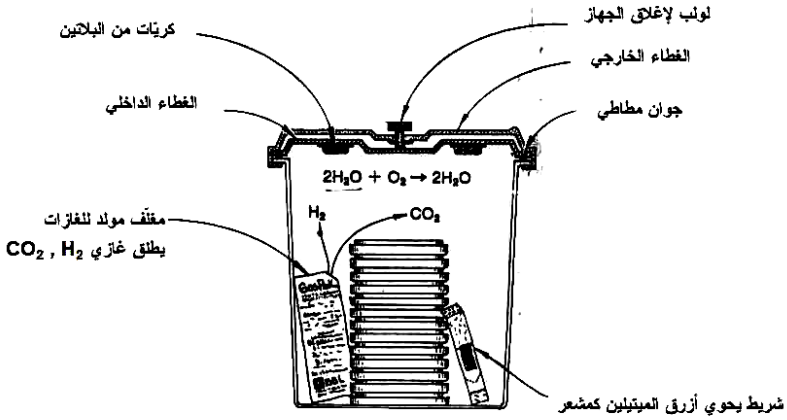
٣- وسط Brewer's Anaerobic Agar:

و هو وسط صلب يستخدم لتنمية البكتيريا اللاهوائية في أطباق بتري، يحوي الوسط على الثيوغليكولات كعامل مرجع و أيضاً صبغة Resazurin كمشعر لـ O/R. و لتأمين شروط ملائمة لنمو البكتيريا اللاهوائية إجبارياً يجب تحضين تلك الأطباق في جو خالٍ تماماً من الأوكسجين و يُستخدم لذلك جهاز خاص Park Anaerobic Jar Gas (الشكل-٢٣)

و الجهاز عبارة عن وعاء مغلق يتم بداخله توليد الهيدروجين H_2 الذي يعمل بدوره على إزاحة الأوكسجين من الوسط عبر الارتباط به و تشكيل الماء وفق التفاعل التالي:

$$2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$$

كما يحوي الجهاز على كريّات صغيرة من البلاتين تؤمّن حدوث التفاعل آنف الذكر عند درجة حرارة المخبر.



(الشكل–٢٣) الجهاز المستخدم في تنمية البكتريا اللاهوائية

يتم توليد الهيدروجين في الجهاز عبر إضافة الماء إلى المغلّف المولّد للغازات. كما يطلق المغلّف أيضاً غاز CO_2 الذي تحتاجه بعض أنواع البكتيريا لنموها. و للتأكد من حدوث جو خال من الأوكسجين داخل الجهاز، يضاف شريط يحوي أزرق الميتيلين كمشعر حيث يزول لونه تماماً في حال نزع الأوكسجين من الوسط علماً بأنه إذا لم يحدث تغيّر في اللون (إزالة اللون) خلال ساعتين من تحضين الأطباق فإن ذلك يُعد مؤشراً على أن الجهاز غير محكم الإغلاق بشكل جيد أو أن التفاعل الكيماوي لم يتم بنجاح.

الطريقة:

١- يتم صب الوسط المغذي في أطباق بتري، و بعد تصلّب الوسط يتم زرعه بطريقة الأطباق المخطوطة بالنوع البكتيري المختبر ثم توضع الأطباق مقلوبة في الجهاز.

٢- يُنزع الغطاء المغلّف للشريط المشعر (الحاوي على أزرق الميتيلين) و يُسحب الشريط جزئياً و عندها يتغير لون الشريط ليصبح أزرق بسبب تعرضه للهواء، ثم يوضع الشريط في الجهاز على أن يكون ظاهراً للعيان.

٣- تُقص زاوية المغلّف المولّد للغازات و يوضع عمودياً في الجهاز.

٤- يتم بواسطة ماصة وضع ١٠مل من ماء الصنبور أو المقطر في الزاوية المفتوحة للمغلّف المولّد للغازات.

٥- يثبت الغطاء الداخلي للجهاز و كذلك الخارجي بحيث يوضع الغطاء الخارجي مباشرة فوق الغطاء الداخلي ثم يتم شد اللولب باتجاه عقارب الساعة.

٦- يتم وضع الجهاز بعد تشغيله في الحاضنة عند (٣٧°)م مدة (٢٤-٤٨) ساعة. و يجب فحص المشعر بعد (٣) ساعات من تشغيل الجهاز للتأكد من خلو الوسط المحيط من الأوكسجين الحرّ، و في حال لم يزل لون المشعر فهذا يعني فشل الطريقة و يجب إعادة العملية من البداية.

الفصل الخامس

طرائق تجهيز المحضرات للفحص بالمجهر الضوئي (الصبغ البسيط)

أولاً – طرائق تجهيز محضرات الخلايا الحية:

يستخدم هذا النوع من المحضرات من أجل دراسة حركة البكتريا، ومراقبة انقسامها، وتبوّغها، ولتحديد أبعادها، وأشكالها، وكذلك عند دراسة تأثير العوامل المحيطية بها والمؤثرة فيها.

١- طريقة القطرة الرطبة Wet mount : وتتم على النحو التالي:

- **في حال كانت البكتريا منماة في وسطٍ مغذٍ سائل:**

الأدوات والمواد اللازمة:

- ممصات معقمة.
- مزرعة بكتيرية منماه في وسط مغذٍ سائل.
- شرائح زجاجية خالية من الدهن.
- مزيج من الكحول والإيتر (يتم التعامل معه بحذر شديد).
- ساترات زجاجية.
- مجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة:

يؤخذ بواسطة ممص معقم كمية من المزرعة البكتيريّة، وتوضع قطرة منها على شريحة زجاجية نظيفة وخالية من الدهن (تعامل الشرائح بشكل مسبق بمزيج من الكحول والإيتر ثم بالتلهيب). تُغطى القطرة بواسطة ساترة زجاجية. ويوضع المحضر على ساحة المجهر ويُفحص.

- **في حال كانت البكتريا منمّاة على وسط مغذٍ صلب (كالآجار المائل):**

الأدوات والمواد اللازمة:

- إبر لاقحة.
- مصباح بنزن.
- مزرعة بكتيرية منماه على وسط مغذٍ صلب.
- شرائح زجاجية خالية من الدهن.
- ساترات زجاجية.
- مجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة:

آ- توضع قطرة من الماء العادي (الصنبور) على شريحة زجاجية نظيفة.

ب- تعقم الإبرة بواسطة اللهب. ويُرفع الغطاء القطني لأنبوب الاختبار بواسطة خنصر وراحة كف اليد اليمنى، ثم يُؤخذ كمية من الكتلة البكتيرية بواسطة الإبرة اللاقحة (التي تكون قد بُرِّدت على السطح الداخلي العلوي لأنبوب الاختبار أو عن طريق غمسها في الوسط المغذي بعيداً عن النمو البكتيري). ثم يمرر الغطاء القطني وفوّهة أنبوب الاختبار على اللهب ويتم إغلاق الأنبوب، وبعدها يوضع على حامل أنابيب الاختبار.

جـ- توضع الكتلة البكتيرية على قطرة الماء الموجودة على الشريحة الزجاجية، وبواسطة الإبر اللاقحة يتم خلط الكتلة البكتيرية مع الماء حتى تتشكل عكارة.

د- تُغطى القطرة بالساترة الزجاجية، بطريقة لا تسمح بتشكيل فقاعات.

يُفحص المحضر بالعدسات الشيئية، بحيث يكون حقل الرؤية مظلماً بعض الشيء ويتم ذلك بإنزال المكثف قليلاً. وفي حال الرغبة بالفحص بالعدسة الغاطسة يتم وضع قطرة من زيت الأرز على الساترة.

٢- طريقة القطرة المعلّقة Hanging drop:

الأدوات والمواد اللازمة:

- شريحة زجاجية ذات تجويف(قعر).
- الفازولين.

- إبر لاقحة.
- ساترات زجاجية.
- مزرعة بكتيرية منماه في وسط مغذٍ سائل.
- مجهر و مستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة: (الشكل-٢٤)

١- تعقم الشريحة الزجاجية ذات التجويف وكذلك الساترة الزجاجية. ثم تُدلك أطراف الساترة الزجاجية بالفازولين.

٢- يوضع بواسطة الإبرة اللاقحة قطرة صغيرة من المعلق البكتيري المراد دراسته على الساترة الزجاجية.

٣- توضع الشريحة الزجاجية فوق الساترة بحيث تكون القطرة في مركز التجويف.

٤- تقلب الشريحة الزجاجية بحذر رأساً على عقب. بحيث تصبح الساترة من الأعلى. ثم يتم الفحص المجهري.

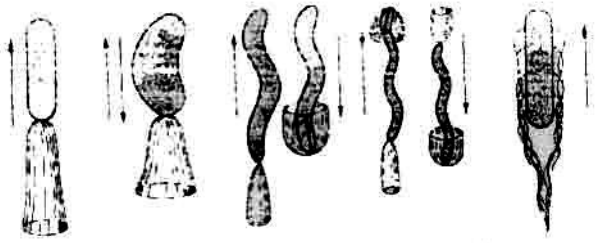
تستخدم طريقة القطرة المعلقة لدراسة حركة البكتريا على وجه الخصوص.

(الشكل-٢٤) مراحل تجهيز القطرة المعلّقة Hanging drop

حركة البكتريا:

تملك الكثير من البكتريا خاصية الحركة. وأكثر أنواع حركة البكتريا انتشاراً هي تلك التي تتم بواسطة السياط. ويتوقف اتجاه حركة الخلايا على مكان وجود السياط على سطحها، فالبكتريا ذوات السوط الواحد في أحد قطبيها Monotriche تتحرك حركة أمامية. أما البكتريا التي تملك حزمة من السياط في أحد قطبيها Lophotriche فتتحرك إلى الأمام بحركة قمعية (تشبه القمع). وعندما تكون السياط موزعة على محيط الخلية Peritriche تتحرك البكتريا إلى الأمام وغالباً بشكل متدحرج (الشكل-٢٥).

(الشكل-٢٥) أنواع حركة البكتريا



أما البكتريا الحلزونية فتتحرك بحركة لولبية إلى الأمام نتيجة تقلصات خلاياها.

يجب التمييز بين الخلايا التي تتحرك بواسطة السياط من تلك التي تتصف بالحركة البراونية Brownian Movement الناجمة عن دفع ذرات السائل للخلية مسبباً اهتزازها غير المنتظم ولمسافة محدودة فقط.

وللتأكد من تواجد السياط، ولتحديد موقعها على الخلية، يجب استخدام طرق تلوين خاصة كما سنرى لاحقاً.

يمكن ملاحظة حركة البكتريا عن طريق إجراء محضرات الخلايا الحية، المجهزة بطريقة القطرة المعلقة والقطرة الرطبة، مستخدمين في أغلب الأحيان عدسات المجهر ذوات التكبيرات الضعيفة، مع تقليل كمية الضوء بحيث يكون حقل الرؤية معتماً نسبياً.

الأدوات والمواد اللازمة:

- مرق لحم مضى على وجوده خارج البراد عدة أيام (مرق لحم فاسد).
- شرائح زجاجية خالية من الدهن.

- ساترات زجاجية.
- مجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة:

لدراسة حركة البكتريا يتم الاستعانة عادة بمزارع فتية (مرق لحم فاسد مثلاً) وذلك بأخذ عينة منها ومشاهدتها بالعدسة الزيتية الغاطسة (بعد وضع قطرة من زيت الأرز على الساترة الزجاجية) عندها يمكن ملاحظة:

- الحركة السريعة للبكتريا اللولبية نتيجة لتقلصات خلاياها.
- حركة البكتريا العصوية نتيجة وجود السياط.
- البكتريا غير المتحركة (عديمة السياط) متنقلة ببطء بفضل تيار السائل.

تجدر الإشارة هنا إلى أن بعض البكتريا تتصف بنوع خاص من الحركة، وذلك عند تماسها مع السطوح الصلبة تسمى هذه الحركة بالحركة الانزلاقية، وهي حركة بطيئة نسبياً (١٠-١٥) ميكرومتر/ثانية. بينما الحركة بواسطة السياط، فتتم أحياناً بسرعة (٢٠٠) ميكرومتر/ثانية.

من جهة أخرى يمكن أن تترك بعض البكتريا في أثناء حركتها بفضل السياط على السطوح الصلبة كالآجار مثلاً خطوطاً طويلة، وأحياناً تلتف هذه الخيوط مشكلة كتلة متجمعة. يمكن ملاحظة ذلك على أحد أطباق بتري الحاوية على مزارع بكتيرية.

ثانياً – تجهيز محضرات الخلايا المثبتة والملونة: Fixed Stained Smears:

تسمى هذه المحضرات أحياناً بمحضرات الخلايا المقتولة لأنه يُعمد في أثناء تجهيزها إلى قتل الخلايا وذلك بإمرارها من خلال اللهب. وإجراء المحضرات المثبتة يصبح ضرورة عند دراسة الكائنات الدقيقة الممرضة. تستخدم هذه الطريقة من أجل دراسة الخواص الشكلية للأحياء الدقيقة. ولإجراء اختبارات النقاوة (عند عزل البكتريا). وأيضاً لتحديد أبعاد الكائنات الحية الدقيقة. وتمتاز هذه المحضرات بإمكانية حفظها لمدة طويلة. يتم تجهيز هذا النوع من المحضرات باتباع ما يلي:

الأدوات و المواد اللازمة:

- مزرعة بكتيرية.
- شرائح زجاجية خالية من الدهن.
- إبر لاقحة.
- مصباح بنزن.
- ملوّن (صبغة).
- ورق نشاف.
- مجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة: (الشكل-٢٦)

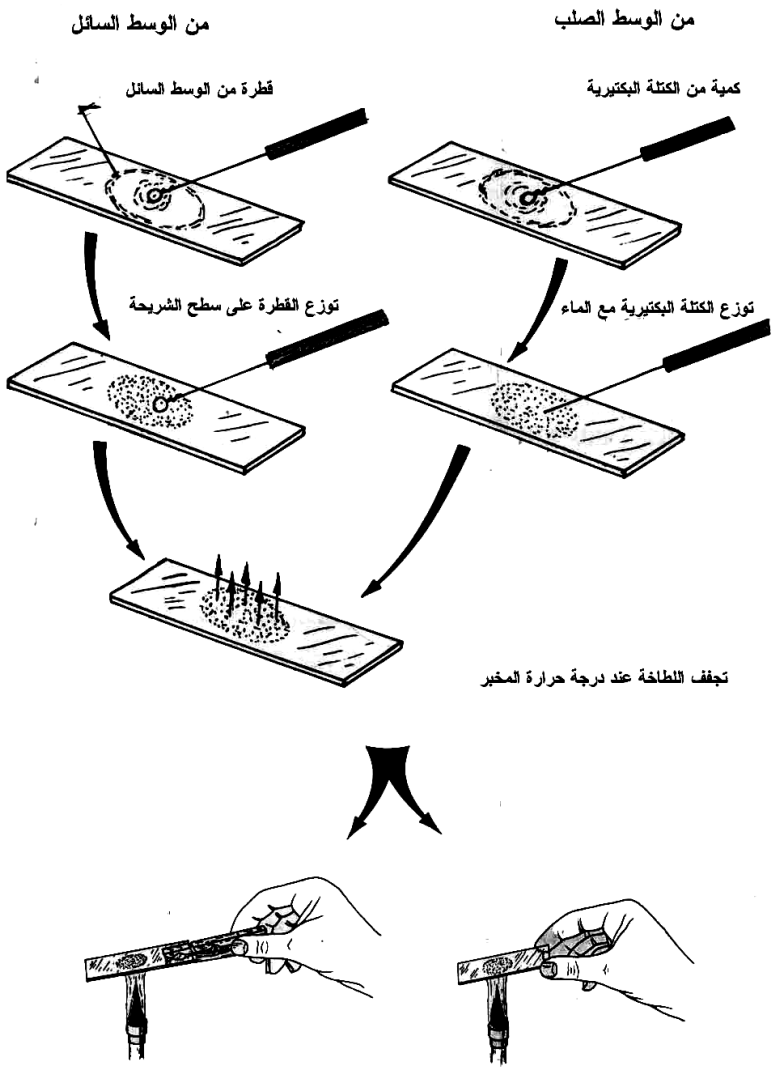
١- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة كمية من الكتلة البكتيرية وتوضع على شريحة زجاجية نظيفة وخالية من الدهن والتي تحوي على قطرة ماء الصنبور. (في حال أخذت العينة من مزارع سائلة لا داعي لوجود قطرة الماء على الشريحة).

٢- توزع الكتلة البكتيرية مع الماء بشكل متجانس ما أمكن بواسطة إبرة التلقيح بحيث تشكل غشاء (لطاخة) رقيق. على مساحة لا تزيد على ٢ سم^{٢} تقريباً.

٣- تجفف اللطاخة عند درجة حرارة الغرفة.

٤- تثبت اللطاخة بإمرارها عبر اللهب (٣-٤) مرات، مع المحافظة على أن تكون اتجاه اللطاخة نحو الأعلى. تهدف هذه الخطوة إلى جعل الخلايا أكثر تقبلاً للصبغات، ذلك باعتبار أن البروتين المقتول يمتص الصبغة بشكل أفضل من الحي. كما تهدف إلى قتل الأحياء الدقيقة الضارة وإلى لصق الخلايا على الزجاج.

٥- يُصبغ المحضر بعدة قطرات من الملوّن المستخدم. وبعد الانتهاء من مدة الصبغ، يغسل المحضر بالماء الجاري ببطء. ثم يجفف بورق النشاف، حيث تُزال كمية المياه المتبقية. ويُشاهد تحت المجهر. وعند استخدام العدسة الغاطسة لا بد من وضع قطرة من زيت الأرز على المحضر.



(الشكل-٢٦) مراحل تجهيز محضرات الخلايا المثبتة من وسط صلب أو سائل

ملاحظة:

هناك طريقة أخرى لتثبيت المحضر غير الطريقة الحرارية (الإمرار من خلال اللهب). هذه الطريقة تسمى بالطريقة الكيميائية التي تُستخدم عند دراسة بنية الخلايا (التراكيب الداخلية) ومن المثبتات الكيميائية:

- الكحول الإيتيلي ٩٦%. مدة التثبيت ١٠-١٥ دقيقة.
- مزيج الكحول الإيتيلي ٩٦% مع الإيتر بنسبة ١:١ لمدة ١٠-١٥ دقيقة أو حتى الجفاف.
- الأسيتون: خلال ٥ دقائق.
- الكحول الميتيلي (الميتانول): خلال ٢-٣ دقيقة.

- الفورمالين.

هناك نوعان من الصبغ: الصبغ البسيط والصبغ المتمايز أو المركب.

عند إجراء الصبغ البسيط:

يتم استخدام صبغة واحدة فقط، وتتلون الخلية بكاملها، ومن الصبغات المستخدمة على سبيل المثال: أزرق الميتلين، الفوكسين.

أما الصبغ المتمايز أو المركب:

فيتم باستخدام أكثر من صبغة. وذلك لإظهار هذا الجزء أو ذاك من الخلية، حيث تتلون مكونات الخلية بصبغات مختلفة. وكمثال على ذلك صبغ الخلايا بطريقة غرام، وصبغ الأبواغ (كما سنرى لاحقاً).

ويستخدم لصبغ خلايا الكائنات الحية الدقيقة صبغات حامضية وأخرى قاعدية، الأولى تدخل في تفاعل مع المواد القلوية في الخلية والثانية مع المواد ذات الطبيعة الحامضية ، وباعتبار أن البروتين يحوي جذوراً قلوية (NH_2) و أخرى حامضية (COOH) فإن المكونات الخلوية تصبغ جيداً بكلا النوعين من الأصبغة.

من الصبغات القاعدية الأكثر استخداماً:

الحمراء: مثل الأحمر المعتدل و البيورين و الغرانين و الفوكسين و هيماتوكسيلين و التونين.
الزرقاء: مثل أزرق فكتوريا و الأزرق المعتدل.
البنفسجية: مثل الجنسيان البنفسجي و الكريستال البنفسجي و الأزرق البنفسجي.
الخضراء: مثل الأخضر المزرق و أخضر المالكيت (المَلَخيت).
السوداء: مثل إندولين.

من الصبغات الحامضية:

الحمراء: مثل الفوكسين الحامضي، ايروتروزين.
السوداء: مثل نيغروزين.
الصفراء: مثل أصفر الكونغو و حمض البكريك.

كما يمكن تقسيم الصبغات إلى:

– صبغات إيجابية (الصبغ الإيجابي): Positive staining:

ويتم صبغ الخلايا عند درجة حرارة الغرفة خلال ٣٠-٦٠ ثانية. حيث تدخل الصبغة المستخدمة لتتحد مع مكونات العينة.

– صبغات سلبية (الصبغ السلبي): Negative staining:

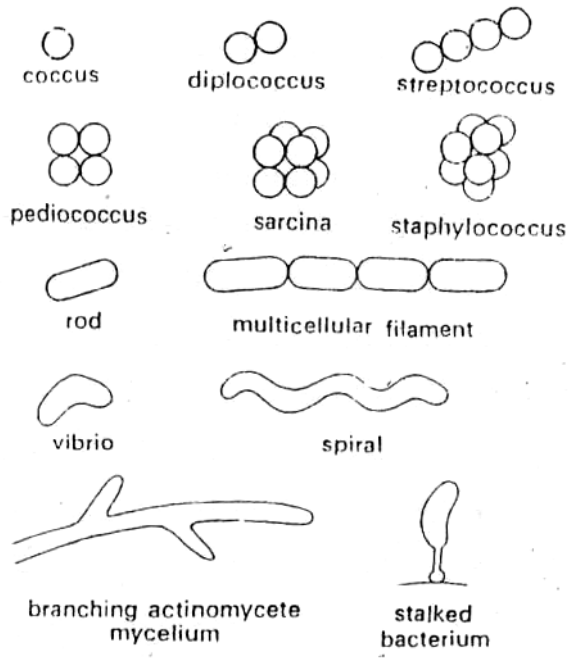
وسميت كذلك لأن الصبغات لا قدرة لها على الدخول إلى الخلية وإنما تقوم بصبغ خلفية الميكروب (الزجاج). في حين تبقى الخلايا بدون صبغ ولذلك تظهر شفافة ضمن خلفية ملونة. ومثال ذلك طريقة صبغ المحفظة (الكبسولة). تستخدم هذه الطريقة من الصبغ من أجل التعرف على شكل الخلايا البكتيرية وأبعادها بدقة، ذلك لأنها لا تعتمد على تسخين المحضّر البكتيري وبالتالي لا تحدث تشويهاً للخلايا البكتيرية، وهي تعطي نتائج دقيقة عند قياس أبعاد الخلايا مقارنة بغيرها من الطرق. وهذه الطريقة مفيدة أيضاً في دراسة البكتيريا اللولبية Spirochaetes التي لا تتلون مباشرة بالصبغات العادية.

الفحص المجهري للبكتريا
(الصبغ البسيط)

تختلف البكتريا فيما بينها بالشكل والحجم والخواص الفيزيولوجية. وتبدو البكتريا بأشكال مختلفة هي: (الشكل-٢٧).

المكورات : Coci مفردها Coccus :

المكورات إما مفردة Micrococci أو مزدوجة Diplococci أو عقدية (سبحية) Streptococcis أو عنقودية Staphylococcis أو مكورات مكعبة Sarcina.



(الشكل–٢٧) الأشكال المختلفة للبكتريا

الفحص المجهري للبكتريا المكورة :

الأدوات والمواد اللازمة :

- مزارع من *Sarcina flova* *، *Azotobacter chroococcum* **:
- لبن رائب.
- صبغات: الفوكسين و أزرق الميتلين.
- خليط من الكحول والإيتر بنسبة (١:١)
- المجهر، ومستلزمات الفحص المجهري: شرائح زجاجية، زيت الأرز، الإبر اللاقحة.

---

* – للحصول على *Sarcina flova* : يترك طبق بتري المحتوي على بيئة الآجار المغذي مفتوحاً في الهواء لمدة (5 – 10) دقيقة ثم يحضّن الطبق عند (٣٧مْ) لمدة (3) أيام، ذلك لأن بكتريا *Sarcina flova* توجد في الهواء.

** – يتم الحصول على *Azotobacter chroococcum* عن طريق ذرّ تربة خصبة فوق طبق بتري يحوي وسطاً مغذياً صلباً مكوّناً من (غ / ليتر ماء مقطر) : مانيت : 20 ، K_2HPO_4 و $MgSO_4$ و $NaCl$ – 0,2 ، K_2SO_4 – 0,1 ، $CaCO_3$ – ٥ , آجار - 20. تبدو مستعمرات *Azotobacter chroococcum* في البداية شفافة تُحيط بحبيبات التربة ثم يصبح لونها بنيّاً . يقوم المشرف بعزل هذه البكتريا وتنميتها قبل موعد الجلسة بأسبوع

الطريقة:

١- يجهز محضرات الخلايا المثبتة والملوّنة كالمعتاد لكل من *Sarcina flova* و *Azotobacter chroococcum* وتصبغ المحضرات بالفوكسين وتشاهد تحت المجهر بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز. لاحظ:

أ- تبدو خلايا *Sarcina flova* على شكل مكورات تتجمع بصورة مكعبات.

ب- تبدو خلايا *Azotobacter chroococcum* على شكل مكورات مزدوجة Diplococcis. ارسم ما تراه ودوّن ملاحظاتك.

٢- يتم التعرف على المكورات السبحية Streptococcis من اللبن الرائب على النحو التالي :

أ- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة كمية قليلة من اللبن الرائب وتوزّع على شريحة زجاجية (بدون إضافة ماء) ليعمل منها لطاخة. ثم يجفف المحضر هوائياً.

ب- تُثبت اللطاخة باستخدام خليط الكحول والإيتر بنسبة (1:1). يُغسل المحضر بهذا الخليط أكثر من مرة وبهذه المعاملة يتم تثبيت المحضر و التخلص أيضاً من الدهن الذي يعيق عملية الفحص المجهري.(يجب الحذر الشديد عند استخدام خليط الكحول مع الإيتر) .

جـ- يصبغ المحضر بأزرق المتيلين لمدة (3-5) دقيقة ويُغسل بالماء ويُجفف ويشاهد بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز.

في أثناء الفحص المجهري يمكن ملاحظة خلايا كروية صغيرة عبارة عن *Streptococcus lactis* تتوضع على شكل سبحة .

العصيات (العصويات):

وتنقسم إلى مجموعتين، الأولى متبوّغة وتسمى Bacillus والثانية عصوية غير متبوغة وتسمى Bacterium.

الفحص المجهري للبكتريا العصوية:

الأدوات والمواد اللازمة:

- مزارع فتية من *Bacillus mycoides* أو أي نوع آخر من الـ*Bacillus* وينبغي أن تكون بعمر (2-3) أيام لأنها تدخل مرحلة التبوغ بعد ذلك.
- مزارع من: *Pseudomonas*.
- صبغة: الفوكسين.
- مستلزمات الفحص المجهري : المجهر، الشرائح الزجاجية، زيت الأرز، الإبر اللاقحة.

الطريقة :

تجهز محضرات الخلايا المثبتة والملونة كالمعتاد لكل من *Bacillus sp* و*Pseudomonas sp* و تلوّن بالفوكسين، وتشاهد تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز. لاحظ :

أ- الشكل العصوي لكلا النوعين.

ب- تلوّن سيتوبلاسم *Pseudomonas* بشكل متجانس. في حين تبدو خلايا *Bacillus sp* غير متجانسة التلون. فسّر ذلك. وارسم ما تراه بالألوان.

الفحص المجهري للبكتريا الضمية والحلزونية (Vibrio - Spiro) :

المواد والأدوات اللازمة :

سماد بلدي، حاضنة، حوجلة، ومستلزمات الفحص المجهري، فوكسين.

الطريقة:

تختلف البكتريا الضمية عن الحلزونية في كون الثانية أطول وأكثر تعرجاً. يمكن التعرف على هذه الأشكال من البكتريا، بأخذ قطرة من منقوع السماد البلدي المحضّن لمدة (3) أيام عند (٣٧)مْ. ويجهز محضر الخلايا المثبتة ويصبغ بالفوكسين : لاحظ وجود أنواع كثيرة من البكتريا ذات الأشكال المختلفة، من بينها ستجد بكتريا ضميّة وأخرى حلزونية.

الفحص المجهري للبكتريا اللولبية Spirochaeta :

الأدوات والمواد اللازمة:

- شرائح زجاجية.
- محلول النيغروسين أو الحبر الصيني.
- إبر لاقحة.
- مجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

الطريقة :

١- يتم تنظيف شريحتين زجاجيتين من أي آثار للدهون (يمكن الاستعانة بمزيج الكحول والأسيتون ١:١).

٢- يتم وضع قطرة صغيرة من الصبغة على الشريحة (إما النيغروسين أو الحبر الصيني).

٣- بواسطة الإبر اللاقحة المعقمة (أو حربة معقمة، أو عود ثقاب نظيف) يؤخذ عينة من جوار أسنان متقيّحة.

٤- يُمزج ما تحمله الإبرة اللاقحة مع الصبغة على الشريحة الزجاجية.

٥- يتم نشر المزيج على سطح الشريحة الزجاجية باستخدام الإبرة اللاقحة أو بواسطة شريحة زجاجية أخرى.

٦- يُترك المحضر ليجف في هواء المخبر.

٧- يُفحص المحضر تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز فوق المحضر.

النتيجة: يمكن ملاحظة البكتريا اللولبية Spirochaeta التي تبدو شفافة في حقلٍ مظلم.

تسمى هذه الطريقة في الصبغ بالصبغ السلبي Negative staining. لاحظ أن الصبغات هنا لا تخترق الميكروب بل تصبغ خلفية المحضر ولذلك تسمى أحياناً بصبغ

الخلفية Background staining إذ تبقى الميكروبات شفافة و يمكن رؤيتها في حقل مظلم.

الفحص المجهري للبكتريا الخيطية (الأكتينومايسيتس) : Actinomycetes:

الأكتينومايسيتس كائنات حية دقيقة، تحتل مكاناً وسطاً بين البكتريا والفطريات وتتبع تصنيفياً للبكتريا، فهي تشبه البكتريا كونها وحيدة الخلية وقطر خيوطها صغير جداً لا يتجاوز (٠.٥-٠.٨) ميكرومتر. وهي تشبه الفطور لأن لها مشيجة طويلة ومتفرعة، وتتكاثر كالفطريات عن طريق تشكيل الأبواغ.

الخواص المزرعيّة للأكتينومايسيتس :

تشكل الأكتينومايسيتس في أثناء نموها على الأوساط المغذية الصلبة، مستعمرات ذوات شكل مميز، حيث يقع قسم من المشيجة داخل الوسط المغذي (الميسيليوم المحاط)، والقسم الآخر يقع فوق الوسط المغذي (ميسيليوم هوائي). ومستعمرات الأكتينومايسيتس عادة زغبية المظهر ، وتبدو ثخينة ، وذات قوام جلدي،ملتصقة بشدة مع الوسط المغذي. أغلب أنواع الأكتينومايسيتس منتجة للصبغات ولذا فإن مستعمراتها تبدو بألوان مختلفة إما زرقاء أو بنفسجية أو وردية أو بيضاء وأحياناً بنية وسوداء .

الخواص المجهرية :

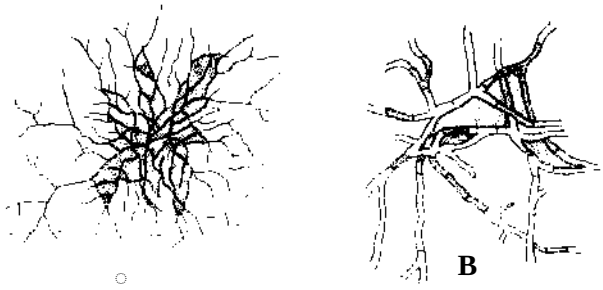
تُشاهد مستعمرات الأكتينومايسيتس، بداية بالتكبير الضعيف للمجهر، وبشكل مباشر في طبق بتري وهي نامية على الوسط المغذي. حيث يمكن مشاهدة قسمٍ من هيفا الميسيليوم يخترق الوسط المغذي (يسمى الميليسيوم المحاط بالوسط) وقسمٍ منه يقع فوق الوسط المغذي (يسمى الميليسيوم الهوائي). ويُلاحظ في طرف الميليسيوم الهوائي الأبواغ وكذلك حوامل الأبواغ. وهذه الأخيرة يمكن أن تكون مستقيمة أو حلزونية (الشكل-٢٨).

بعد الفحص المباشر للأكتينومايسيتس وهي على الوسط المغذي. يتم تجهيز محضر على النحو التالي :

الأدوات والمواد اللازمة :

- مزرعة تحوي على الأكتينومايسيتس *Streptomyces* مثلاً.
- شرائح زجاجية.
- إبر لاقحة أو حربات.
- مصباح بنزن.
- المجهر ومستلزمات العمل بالمجهر.

(الشكل– ٢٨–آ) أشكال حوامل الأبواغ عند الأكتينومايسيتس التابعة للجنس *Actinomyces*



(الشكل–28– ب) A– ميسليوم الأكتينومايسيتس

B– ميسليوم الفطور

الطريقة :

١- يُؤخذ بواسطة إبرة قاسية (أو حربة) جزء من مستعمرة الأكتينومايسيتس *Streptomyces chromogens* (على سبيل المثال) مع قسم من الوسط المغذي المنمّى عليه وذلك ليتسنى مشاهدة الميليسيوم المحاط والهوائي.

٢- يُجهز شريحتان زجاجيتان، يوضع على الأولى ما تم أخذه بواسطة الإبرة (أو الحربة). ثم توضع الشريحة الثانية على الشريحة الأولى ويتم ضغطها قليلاً. بعدها تُرفع الشريحة الثانية عن الأولى ويتم استبعادها.

٣- يعامل المحضر بالماء بحذر، ثم يجفف، ويثبت كالمعتاد من خلال اللهب ويلوّن بالفوكسين. يُفحص المحضر بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز.

يمكن ملاحظة أن الميليسيوم وحيد الخلية، إلا أن مشاهدة الأبواغ وكذلك تمايز الميليسيوم ليس ممكناً دائماً.

في حال تم صبغ محضر من الأكتينومايسيتس بطريقة غرام فستبدو موجبة لغرام.

وهناك أنواع بكتيرية ذوات أشكال مميزة نستعرض أمثلة عنها:

الفحص المجهري لل *Nocardia* :

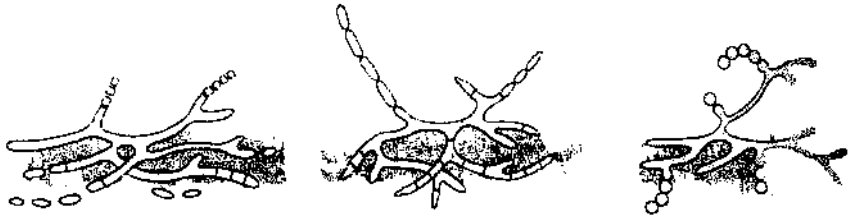
الميسيليوم الهوائي عند هذه البكتريا معدوم أو أنه نامٍ بشكل ضعيف. لكن تشكل وهي فتية ميسيليوماً سرعان ما يبدأ بالتفصيص إلى أقسام وتنفصل إلى أشكال عصوية ومن ثم تتحول إلى عصيات قصيرة، وفي بعض الأحيان إلى أشكال مكورة. وليس ثمة أبواغ حقيقية .

الخواص المزرعيّة :

تبدو مستعمرات الـ *Nocardia* بشكل عجيني وتكون ملونة بألوان مختلفة، شأنها في ذلك شأن الأكتينومايسيتس .

الخواص المجهرية :

1- يتم تجهيز المحضر للفحص المجهري عن طريق أخذ عينة من مستعمرة *Nocardia rubra* (مستعمرة ذات لون أحمر) بالطريقة المبينة سابقاً بالنسبة للأكتينومايسيتس .حيث يمكن ملاحظة الميسيليوم المفصّص إلى أشكال عصوية . والعصيات المتحولة إلى أشكال مكوّرة (الشكل-٢٩) .



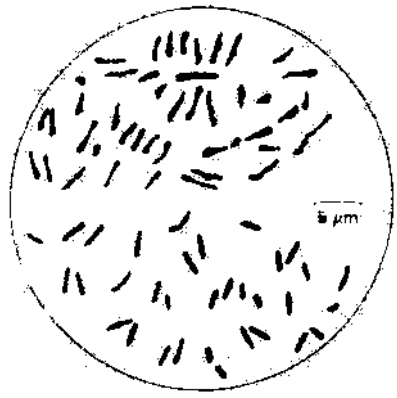
A B C

(الشكل–٢٩) *Nocardia* : A - B – لاحظ الميسليوم المفصص إلى عصيات
C – لاحظ تحوّل العصيات إلى أشكال مكوّرة

الفحص المجهري لـ *Mycobacterium* :

الـ *Mycobacterium* كائنات لا تشكل ميسيليوماً، تبدو وهي فتية على شكل عصيات ذوات محيطات غير منتظمة بشكل نجمي وأحياناً بنموات جانبية، أما خلايا المستعمرات القديمة فهي عبارة عن عصيات متفرعة تتفصص إلى عصيات أكثر قصراً ومن ثم تأخذ شكلاً كروياً .

يتم تجهيز محضر للفحص المجهري من *Mycobacterium flavum*. يُثَبَّت ويلوّن بالفوكسين كالمعتاد ، ويُفحص بالعدسة الغاطسة، حيث يمكن ملاحظة العصيات المتفرعة (الشكل–٣٠).



(الشكل–٣٠) *Mycobacterium*

الفحص المجهري للريكتسيا Rickettsiae

الريكتسيات عبارة عن متطفلات تعيش إجبارياً داخل الخلايا (باستثناء *Rickttsia quintanas*) ذوات أشكال عصوية وتوجد عادة مثنى مثنى، يمكن مشاهدتها في الأنسجة المصابة بالفحص المجهري المباشر وذلك بطريقة جيمس أو جيمينسين حيث

تبدو بنفسجية اللون وعلى شكل عصيات مكوّرة ، بأطوال مختلفة تتراوح بين (0.25-2) ميكروميتر. في أغلب الأحيان تصادف الريكتسيات أزواجاً ويمكن أن تشكل سلاسل قصيرة. تبدو أصغر الريكتسيات هي *Coxiella burnetii* (أبعادها 0.25 × 1 ميكروميتر). على شكل عصية ملونة داخل سيتوبلاسم الخلايا المصابة. أما ريكيتسيا الحمى المبرقشة فهي أكبر (العرض 3-0.6 ميكروميتر، والطول 1.2 ميكروميتر). وتوجد في نواة وسيتوبلاسم الخلايا المصابة ، وغالباً ما تكون محاطة بهالة يعتقد خطأً بأنها كبسولة . تبدو الريكتسيات سالبة لغرام عند صبغها بطريقة غرام.

صبغ الريكتيسيا بطريقة جيمس :

يحضّر المحلول المركّز الابتدائي الحاوي على :

بودرة صبغة جيمس	0.5 غ
غليسيرين	33 مل
ميتانول مطلق (خالٍ من الأسيتون)	33 ملم

تُذاب بودرة جيمس في الغليسرين بدرجة حرارة (55-٦٠)م لمدة (1.5-2) ساعة، يُضاف بعد ذلك الميتانول ، ويُخلط بشكل جيد مع البودرة، ويُترك المحلول المتكوّن لحين الاستخدام عند درجة حرارة الغرفة .

عند استخدام جزء واحد من المحلول المركّز الابتدائي، يخفف بواقع (40-50) مرة بالماء المقطر.

الطريقة :

1- تُجفف العينة على الشريحة الزجاجية بدرجة حرارة الغرفة . وتُثبت لمدة (5) دقائق بالميتانول المطلق .

2- يُضاف إلى العينة محلول جيمس المحضر حديثاً بالطريقة السابقة وذلك لمدة ساعة.

3- لإزالة الصبغة الزائدة يُغسل المحضر بالكحول الإيتيلي. ثم يجفف المحضر في الهواء ويُشاهد تحت المجهر .

صبغ الريكيتسيا بطريقة جيمينس :

يحضر المحلول المركز الابتدائي الحاوي على :

فوكسين قاعدي	10 غ
كحول إيتيلي	100 مل
فينول 4% ، مائي	250 مل
ماء مقطر	650 مل

يُذاب الملوّن في البداية بالكحول الإيتيلي، ثم تُضاف العناصر الأخرى. ويُحضَّن المحلول الملوّن قبل الاستخدام لمدة (48) ساعة عند(٣٧)مْ. يُخفف (يمدّد) المحلول المركّز الابتدائي عند الاستخدام بنسبة (2.5:1) بواسطة مزيج من 3.5 مل 0.2 مل M من Na_2HPO_4 و 15.5 مل 0.2 M من Na_2HPO_4 و 19 مل ماء مقطر. ويتم من ثَمَّ ترشيح الملوّن، الذي يمكن أن يُحفظ لمدة (4–5) أيام. ولكن يجب أن يرشّح في كل مرة قبل الاستخدام .

عند صبغ الريكتسيا بهذه الطريقة يتطلب أيضاً وجود ٠.٨% من محلول مائي لأخضر الملاكيت (الدهنج) بحمض الأوكزاليك. محضراً حديثاً .

الطريقة :

1- تثبت العينة على الشريحة الزجاجية باللهب ويوضع عليها المحلول الملوّن لمدة (1- 2) دقيقة .

2- يُغسل المحضر بالماء العادي ، ويلوّن بأخضر الملاكيت (الدهنج) لمدة (5–10) ثوان .

3- يُغسل المحضر من جديد بالماء العادي ويُعامل للمرة الثانية بأخضر الملاكيت.

4- يُغسل المحضر جيداً بالماء العادي ويُجفف بورق النشاف ويُشاهد تحت المجهر.

الفحص المجهري للميكوبلازما

من المرجح أن تكون الميكوبلازما أصغر البكتريا التي يمكن ملاحظتها بالمجهر الضوئي. ومن الصعوبة بمكان إعطاء توصيف محدد لشكلها وذلك بسبب مظهرها المتغير

باستمرار. تبدو مستعمرات الميكوبلازما عند فحصها بالمجهر وبشكل مباشر على طبق بتري مشابهة للبيض المقلي . ولدراسة الميكوبلازما تُسْتَخدم طريقة القطرة المعلّقة، أو النقطة الرطبة، على أن تكون ساحة الرؤية معتمة بعض الشيء .

يتم صبغ محضرات الميكوبلازما باستخدام طريقة جيمس السابقة مع بعض التعديلات، حيث يستخدم محلول بوين لتثبيت المحضر. يتكون محلول بوين من :

حمض البيكرين المشبع بالماء 75 مل (ينحل حمض البيكرين 1.2 غ /100 مل عند ٢٠مْ) . فورمالين 25 مل. حمض الخل الجليدي 5 مل. تُخلط المكونات بعضها مع بعض جيداً. ويُحفظ المحلول في زجاجة مزودة بسدادة.

تقدير أبعاد الكائنات الحية الدقيقة بواسطة المجهر الضوئي :

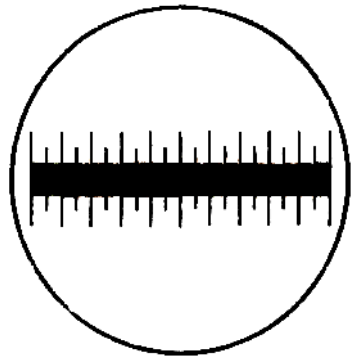
من المؤسف حقاً أن عملية قياس أبعاد الميكروبات بواسطة المجهر تتم في كثير من الأحيان بشكل غير دقيق، وذلك للصعوبات التقنية التي لا مناص منها. فأبعاد خلايا الميكروبات المقاسة بمحضرات الخلايا الحية لن تكون دقيقة وذلك لوجود هالة حول هذه الخلايا. والصعوبة الأخرى تكمن عند إجراء المحضرات المثبتة والملونة حيث يتم تشويه الميكروبات إلى حدٍ معين . إضافة لذلك فإن الصبغات المستخدمة تجعل الجدار الخلوي أثخن مما هو عليه في الواقع . على العموم يعتبر تقدير أبعاد الميكروبات (بكتريا، فطريات) وكذلك الأبواغ من أهم الصفات التصنيفية التي تؤخذ بعين الاعتبار .

يستخدم الميكروميتر كوحدة قياس لتقدير أبعاد الميكروبات وذلك حسب النظام العالمي للقياس .والميكروميتر يساوي 10^{-6} م .

تجرى عملية قياس أبعاد الخلايا بواسطة شريحة القياس الميكروميترية العينية و الشيئيّة.

شريحة القياس الميكروميترية الشيئية :

هي عبارة عن شريحة زجاجية زُوّدت بمسطرة مدرجة بطول (١) ملم ومقسمة إلى (100) تقسيمة (الشكل-٣١)



(الشكل–٣١) شريحة القياس الميكروميترية الشيئية

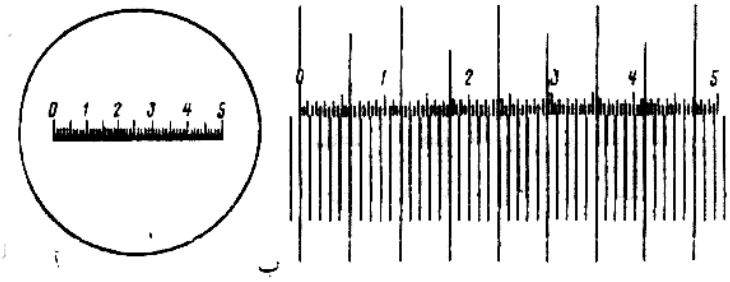
قيمة كل تقسيمة تساوي (10^{-5}م) أو 10 ميكروميتر. توضع هذه الشريحة على مسرح المجهر في أثناء القياس ، وتُستخدم لتقدير قيمة التقسيم الواحد لشريحة القياس الميكروميترية العينيّة .

شريحة القياس الميكروميترية العينيّة :

هي عبارة عن صفيحة قرصيّة الشكل زُوِّدت أيضاً بسلّم مدرج بطول (5) ملم ومقسّم (50) تقسيمة (الشكل–٣٢) .

تُستخدم هذه الشريحة للقياس المباشر لأبعاد الميكروبات، وتوضع بين العدسات العينيّة للمجهر .

في أثناء القياس تجرى عملية تطابق تدريجات الميكروميترات الشيئيّة والعينيّة، بحيث يكون صفري التدريجتين منطبقين تماماً .تجدر الإشارة إلى أنه في أثناء استخدام العدسة الغاطسة لابد من وضع قطرة من زيت الأرز على شريحة القياس الميكروميترية الشيئيّة .



(الشكل–٣٢) أ– شريحة القياس الميكروميترية العينية

ب– تطابق شريحتي القياس العينية الشيئية

لتبيان كيفيّة تحديد قيمة التقسيم الواحد لشريحة القياس الميكروميترية العينيّة نسوق المثال التالي :

في حال تطابق (5) تقسيمات لشريحة القياس الميكروميترية الشيئيّة، مع (30) تقسيمة من شريحة القياس الميكروميترية العينيّة فسيكون قيمة التقسيمة الواحدة لشريحة القياس الميكروميترية العينيّة (٥×١٠=٥٠ ميكرومتر و٣٠:٥٠)= ١.٦٦ ميكروميتر. بعد ذلك ننتقل إلى القياس المباشر لأبعاد الميكروبات بمساعدة شريحة القياس الميكروميترية العينيّة فإذا كان طول الخلية المقاسة مساوياً (3) تقسيمات مثلاً، والعرض مساوياً تقسيماً واحداً ، فإن أبعاد الخلية ستكون :

٣ × ١.٦٦ = ٤.٩٨ ميكروميتر و ١ × ١.٦٦ = ١.٦٦ ميكرومتر

الفصـــل السَّادس
دراسة بنية الخلية البكتيرية
(الصبغ المركب)

الخلية البكتيرية عبارة عن نظام حيّ ومعقد، تتصف مكوناته بتنظيم عالي المستوى، ولكل مكوّن وظيفته الحياتية ، والعلاقة المتبادلة بين هذه المكونات هي التي تضمن حياة الخلية .

لدراسة التراكيب الداخلية للخلية البكتيرية لابد من استخدام طرق تلوين خاصة.

وحتى نتمكن من الوقوف على تبعيّة أي كائن حي دقيق لهذا الجنس أو ذاك، من الضروري إجراء تلوين خاص للخلية أو للمواد المكوّنة لها ومن هذه الطرق:

1– صبغ البكتريا بطريقة غرام :

يعتبر صبغ الخلايا البكتيرية بطريقة غرام أهم الطرق الواجب إجراؤها عند تعريف البكتيريا Identification.

لاحظ العالم غرام Ch.Gram عام ١٨٨٤م بعد صبغ البكتيريا بواسطة الجنسيان البنفسجي و من ثم معاملتها بمحلول من اليود، أن بعض البكتيريا تفقد هذه الصبغة بعد المعاملة بالكحول فأطلق عليها البكتيريا سالبة لغرام؛ في حين بقيت بكتيريا أخرى ملوّنة بالجنسيان البنفسجي مع اليود حتى بعد المعاملة بالكحول أطلق عليها موجبة لغرام. و هناك تفسيرات مختلفة لهذه الظاهرة يمكن الرجوع إلى الجزء النظري للمقرر للاطلاع عليها

على العموم ، تبدأ خطوات صبغ الخلايا بطريقة غرام، بمعاملة محضر الخلايا المثبتة بالصبغة الأساسية، (الكريستال البنفسجي) ومن ثم بمحلول اليود، الذي يشكل مع الكريستال البنفسجي معقداً غير ذوّاب في الماء، بينما ينحل بالكحول. بعدها يُعامل المحضر بالكحول. عند ذلك تتباين الخلايا: فالخلايا موجبة الغرام تحتفظ بالمركب المتكوّن وتصبح زرقاء اللون، أو بنفسجية غامقة، بينما تصبح الخلايا سالبة الغرام بدون لون

(شفافة) ولكي تصبح مرئية، يُعامل المحضر بصبغة مباينة (كالفوكسين مثلاً). وهذه بالتفصيل خطوات صبغ الخلايا بطريقة غرام .

المواد والأدوات اللازمة:

محلول الكريستال البنفسجي، محلول لوغول، كحول ٩٦% صبغة الفوكسين؛ مجهر ومستلزمات الفحص المجهري. مزارع بكتيرية معروفة مسبقاً علاقتها بصبغة غرام.

الطريقة :

1- يُجهز غشاء (لطاخة) على شريحة زجاجية نظيفة وخالية من آثار الدهن، ويُثبَّت كالمعتاد بواسطة اللهب .

2- يُصبغ الغشاء (اللطاخة) بمحلول الكريستال البنفسجي لمدة دقيقة واحدة.

3- بدون أن يُغسل المحضر بالماء، يُصبغ بمحلول لوغول لمدة دقيقة واحدة (حتى اسوداد المحضر تماماً). ومن الأفضل عند الصبغ بمحلول لوغول، مسك الشريحة بوضع مائل .

4- وبدون أن يُغسل المحضر بالماء، يعامل بالكحول ٩٦% لمدة (١٥-20) ثانية مع التحريك المستمر للشريحة الزجاجية. والهدف من ذلك هو التخلص من الصبغة. وهي مرحلة حساسة، ذلك لأن زيادة فترة معاملة المحضر بالكحول عن الفترة المحددة، يؤدي إلى جعل الخلايا موجبة الغرام عديمة اللون ، وعند تقليل مدة المعاملة بالكحول، فإن المحضر سيبدو ملوناً بشكل زائد.

5- يغسل المحضر بالماء العادي (الصنبور). ويُصبغ بالفوكسين لمدة (1) دقيقة.

النتيجة :

تتلون الخلايا الموجبة لغرام بلون بنفسجي غامق، في حين تتلون الخلايا سالبة الغرام بالفوكسين (لون أحمر) .

هذا وقد خضعت طريقة الصبغ بغرام ، لعدة تعديلات نذكر منها :

طريقة غرام بتعديلات سينايف :

بعد تجهيز المحضر يوضع على اللطاخة المثبتة ورقة ترشيح مسطحة بعرض (3) سم، مشبعه بشكل مسبق بمحلول كحولي ١% من الكريستال البنفسجي، ويُنْتَظر حتى تجف ورقة الترشيح (الورقة الجافة يمكن حفظها لمدة طويلة لحين الاستخدام). ثم يصب على ورقة الترشيح (2–3) قطرة ماء، وتبقى على المحضر هكذا لمدة (2) دقيقة.

أما الخطوات اللاحقة فهي ذاتها التي شرحت سابقاً .

صبغ الخلايا بطريقة غرام مع تعديلات بيورك : تجهز بداية المواد التالية

1– المحلول : أ – المكوّن من : الكريستال البنفسجي 1 غ
ماء مقطر 100 مل

2– المحلول ب : المكوّن من : بيكربونات الصوديوم 1 غ
ماء مقطر 100 مل

3– المرسّخ (المثبت اليودي):المتكون من : يود 1 غ
يودات البوتاسيوم 2 غ
ماء مقطر 100 مل

يُطحن اليود مع يودات البوتاسيوم في هاون. ويضاف الماء ببطيء مع استمرار الطحن حتى تمام ذوبان اليود ، ومن ثم يُحفظ في عبوة زجاجية معتمة .

4– مزيل اللون (يجب توخي الحذر الشديد في أثناء التعامل معه كونه سريع الاشتعال)
ويتكون من : إيتر إيتيلي 1 حجم
أسيتون 3 حجم

5– الصبغة الإضافية (المباينة) : وتتكوّن من : صفرانين 2.5 غ
ماء مقطر 100 مل

خطوات الطريقة :

1– تعامل اللطاخة (الغشاء) المجففة بالهواء والمثبتة باللهب /كالمعتاد/ بالمحلول أ. وتُضاف 2–3 قطرة من محلول ب . لمدة (2) دقيقة.

2– تغسل اللطاخة بالمرسّخ اليودي . وتُغمر من ثم لمدة (2) دقيقة بالمرسّخ اليودي المحضر حديثاً .

3– تُغسل اللطاخة لمدة (2) ثانية بالماء العادي (الصنبور) القادم إلى اللطاخة ببطئ وبزاوية مائلة . ثم تجفف المنطقة المحيطة باللطاخة بورق الترشيح ، بينما تُترك اللطاخة ذاتها بدون تجفيف .

4– يُمسك المحضر بشكل مائل ، وتعامل اللطاخة بواسطة قطرات من المذيب المزيل للّون ، حتى يصبح المذيب الخارج من الطرف الآخر للشريحة الزجاجية عديم اللون . بعد ذلك تُجفّف اللطاخة في الهواء .

5 – تُغمر اللطاخة لمدة (5–10) ثانية بالصبغة الإضافية (المباينة) .

6 – يُعامل المحضر بالماء العادي القادم إلى اللطاخة ببطئ وبزاوية مائلة ، حتى زوال لون الصبغة من ماء الغسيل .تجفف اللطاخة بعد ذلك بورق الترشيح وتفحص بالغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز .

عند اتباع أيٍ من الطرق آنفة الذكر ، فإن الخلايا موجبة الغرام تتلون بلون أزرق أو بنفسجي ، في حين سالبة الغرام تتلوّن باللون الأحمر .

ملاحظات حول صبغ الخلايا بطريقة غرام :

1– تتوقف نتائج صبغة غرام على عمر المزارع البكتيرية ، فالخلايا القديمة والميتة تبدو دائماً على أنها سالبة لغرام .

2– البكتريا سالبة غرام يمكن أن تظهر موجبة غرام في حال :

أ –كانت اللطاخة سميكة أكثر من اللازم .

ب– لم تُجرَ عملية إزالة اللون بشكل جيد بواسطة الكحول وضمن المدة المحددة فقط.

3– البكتريا موجبة غرام يمكن أن تبدو سالبة لغرام ، عند الإفراط في عملية إزالة اللون.

4- بعض أنواع *Bacillus* تصبح موجبة لغرام فقط بعد عدة انقسامات من إنبات البوغ.

5- في أثناء تلوين بعض البكتريا مثل (*Corynebacterium, Proteus*) بطريقة غرام . فإن قسماً منها يبدو موجباً لغرام والآخر سالباً لغرام .

على العموم ، فإنه للحصول على نتائج جيدة ، يجب تحضير لطاخة شفافة ما أمكن. و بحيث تكون بالكاد مرئية عبر زجاج الشريحة. كما أن البكتريا المدروسة يجب أن تكون حيّة وفتيّة. و من المفيد استخدام كائنات دقيقة معروفة علاقتها بصبغة غرام ، وذلك من باب المقارنة فيمكن استخدام *Bacillus mycoides* و *Saccharomyces cerevisiae* كمثال للكائنات الحية الدقيقة موجبة لغرام. واستخدام *Escherichia coli* كمثال للبكتريا سالبة لغرام.

2 – صبغ البكتريا المقاومة للأحماض Acid fast Staining :

تتصف بهذه الخاصة بكتريا *Mycobacterium* ، وكذلك الأكتينومايسيتس و الـ *Nocardia*. وقد لوحظت هذه الظاهرة من قبل العالم أرليخ 1882. حيث لم يتمكن من إزالة صبغة الأنيلين بواسطة الحموض لمحضرات من بكتريا السل *Mycobacterium tuberculosis*. تتميز البكتريا المتصفة بهذه الخاصية، بصعوبة تقبل خلاياها للصبغات. وقدرتها الشديدة على الاحتفاظ بالصبغة حتى في حال استخدام الكحول الحامضي في عملية إزالة الصبغة. ترتبط هذه الخاصية باحتواء البكتريا المقاومة للأحماض على نسبة عالية من المواد الشمعية في جدرها وأغشيتها الخلوية. وهذه المواد تتميّز بقدرة عالية على الاحتفاظ بالصبغة المستخدمة.

صبغ البكتريا المقاومة للأحماض بطريقة زيل – نلسون :

Acid – fast staining . Ziehl – Neelson Method

يتم تجهيز المحاليل والصبغات التالية:

1- الفوكسين الكربولي ويتكون من:

فوكسين قاعدي	0.3 غ

ايتانول 95 % 10 مل

فينول (كريستالي ، منصهر عند التسخين) 5 مل

ماء مقطر 95 مل

يذاب الفوكسين القاعدي في الإيتانول . من ثم يُضاف إليه الفينول المذاب بالماء. يُخلط المحلول ويُترك ليبقى عدة أيام . ويُرشح قبل الاستخدام .

2– مذيب لإزالة اللون ويتكون من: الإيتانول 95 % 97 مل

حمض كلور الماء (مركز) 3 مل

3– الصبغة الإضافية : أزرق الميتيلين 0.3 غ

كحول ايتيلي 30 مل

محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1%) 70 مل

يتم إذابة أزرق الميتيلين في الكحول، ثم يُضاف إليه هيدروكسيد الصوديوم.

الطريقة :

1– تجهز اللطاخة وتجفف وتثبت بواسطة اللهب كالمعتاد ، وتغمر بصبغة الفوكسين الكربولي (يمكن أو يوضع على المحضر ورقة ترشيح مشبعة بصبغة الفوكسين الكربولي). تُسخن الشريحة الزجاجية بحذر من الجهة السفلية على مصباح اللهب ، أو على صفيحة معدنية ساخنة. حتى خروج البخار، وذلك بدون أن يحدث غليان، ودون أن يجف المحضر . ويمكن عند الضرورة إضافة (1–2) قطرة من الماء إلى المحضر. يبقى المحضر بهذه الظروف لمدة (5) دقائق ويسخّن دورياً كلما اقتضت الحاجة.

2– يُبرّد المحضر (تزال ورقة الترشيح المشبعة بصبغة الفوكسين الكربولي في حال وجودها) . ويُغسل بالماء العادي ، حتى زوال لون الصبغة من ماء الغسيل الخارج من الطرف الآخر للشريحة الزجاجية .

3– تُغمر اللطاخة بالمحلول المذيب المزيل للّون ، وتُغسل مباشرة بالماء . تُكرر عملية إزالة اللون بالمذيب والغسيل بالماء، حتى يصبح لون اللطاخة ورديا باهتاً.

4– تُعامل اللطاخة لمدة (20–30) ثانية بالصبغة الإضافية ، ومن ثم تُغسل بالماء العادي وتُجفف بورق الترشيح وتُشاهد بالعدسة الغاطسة، بعد وضع قطرة من زيت الأرز .

النتيجة:

تبدو البكتريا التي تتمتع بخاصية عدم التأثر بالحموض مصبوغة باللون الأحمر، أما البكتريا التي لا تتمتع بهذه الخاصية فتظهر مصبوغة باللون الأزرق .

3 – صبغ الأبواغ البكتيرية :

تُشكل بعض الأجناس البكتيرية مثل *Bacillus* و *Desulfotomaculum* و البكتيريا الكروية *Sporosarcinia* و بعض بكتيريا *Spirochetes* أبواغاً داخلية Endospores تظهر الأبواغ عند الفحص المجهري لماعة و تصبح مقاومة للصبغ بالطرق الاعتيادية التي تصبغ بها عادة الخلايا الخضرية (الإعاشية).

الأبواغ عبارة عن تشكيلات مكورة أو بيضاوية أو أسطوانية أو إهليلجية. وتتمتع البكتريا المتبوّغة بمقاومة عالية لظروف الوسط الخارجي غير المناسبة، مقارنة مع البكتريا الإعاشية (الخضرية). يمكن أن تكون الأبواغ المتشكلة ضمن الخلايا بأقطار لا تتجاوز قطر الخلية نفسها، كما هو الحال عند الجنس *Bacillus*. أو أن يكون قطر الأبواغ، أكبر من قطر الخلايا، كما هو الحال عند الجنسين *Plactridium* و*Clostridium*.

عند ملاحظة البكتريا المتبوغة الحية تحت عدسة المجهر، تظهر أبواغها العاكسة للضوء، وذلك نتيجة تراكم المواد البروتينية والدهنية فيها.تمتاز الأبواغ بمقاومتها لتأثير الحموض، وبالتالي يصعب تلوينها، و يعود تفسير ذلك إلى وجود غلاف قاس يحيط بالبوغة، وكذلك قلة الماء الحر، وارتفاع محتواها من الدهون. والجدير ذكره أن الأبواغ تظهر عديمة اللون، عند صبغها بطريقة غرام .

انطلاقاً من الخواص الفيزيوكيميائية للأبواغ، ونظراً لقساوة غلاف البوغة قليل النفاذية، يُلجأ في أثناء تلوينها في البداية، إلى استخدام مواد كيميائية مغيّرة لتركيب الغلاف. إلا أن عملية التلوين اللاحقة للأبواغ ، ستؤدي في الوقت ذاته ، إلى تلوين

سيتوبلازم الخلية، ولهذا فإن الخلايا ستبدو تحت المجهر ملوّنة بشكل متجانس، ولكي يتم تلوين الأبواغ فقط، دون السيتوبلاسم، ينبغي إجراء عملية إزالة الصبغة من السيتوبلاسم ، وإبقائها في البوغة فقط ، وهذا الأمر يمكن تحقيقه، ذلك لأن الصبغة الممتزة من قبل البوغة ، تكون أكثر ثباتاً من الصبغة الممتزة من قبل سيتوبلاسم الخلية .

صبغ الأبواغ البكتيرية بطريقة شيفر و فلتون Schaeffer and Fulton method:

الأدوات والمواد اللازمة :

1– مزارع من *Clostridium sporogenes*, *Bacillus mycoides*

2– صبغة أخضر الملاكيت: (أخضر ملاكيت 5 غ، ماء مقطر 100 مل . تذاب الصبغة في الماء).

3– صبغة السفرانين (0.25 غ سفراني ، كحول ٩٦% مل، ماء مقطر 100 مل. يذاب السفرانين في الكحول ، ثم يضاف الماء المقطر، ويرشّح).

4– حمام مائي، مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة :

1– يجهز غشاء (لطاخة) بالطريقة المعتادة (تجفيف ثم تثبيت باللهب).

2– تُغمر اللطاخة بصبغة أخضر الملاكيت، و يُسَخَّن المحضر فوق اللهب (يمكن أن يوضع المحضر على حامل الشرائح فوق حمام مائي عند درجة الغليان) إلى أن يبدأ البخار في التصاعد من المحضر، وذلك لمدة (3–5) دقائق، ويُراعى عدم جفاف الصبغة أو غليانها.

3– يُغسل المحضر بالماء العادي لإزالة الصبغة الزائدة لمدة نصف دقيقة.

4– يُغمر المحضر بصبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة . ثم يُغسل المحضر بالماء العادي ويُجفف ، ويُشاهد تحت المجهر .

النتيجة :

ستظهر الخلايا الإعاشية (الخضرية) بلون أحمر. في حين أن الأبواغ المنفردة ستظهر بلون أخضر. أما البكتريا المتبوغة، فإن أبواغها ستظهر بلون أخضر، في حين بقية الخلية ستتلون بالأحمر .

صبغ الأبواغ البكتيرية بطريقة دورنر: Dorner's Method

المواد والأدوات اللازمة:

1 – مزارع من البكتريا المتبوغة *Bacillus sp* أو *Clostridium*.

2 – الفوكسين الكربولي (انظر طريقة تحضيره سابقاً) .

3 – مزيج حمض- كحول (97 مل ايتانول 95 %، حمض كلور الماء المركز 3 مل).

4 – محلول النيغروزين المائي، يحضر على النحو التالي: يُحل (10) غ نيغروزين في(100) مل ماء مقطر ويوضع في حمام مائي لمدة (30) دقيقة ثم يُبرّد . يمكن حفظه بشكل جيد بإضافة (0.5) مل من الفورمالين. يتم ترشيح الخليط قبل الاستخدام.

5 – المجهر ومستلزمات العمل المجهري .

الطريقة:

1– تُغطى اللطاخة المجففة في الهواء والمثبّتة باللهب ، بقطعة من ورق النشاف، مشبعة بمحلول الفوكسين الكربولي. ويتم تبخير المحضر لمدة (5–10) دقائق وذلك بوضع الشريحة الزجاجية إما فوق مصباح اللهب أو فوق صفيحة معدنية ساخنة (أو على حامل الشرائح فوق حمام مائي مضبوط عند درجة حرارة ١٠٠م) ويجب الانتباه بحيث لا تغلي الصبغة.وإذا اقتضت الحاجة يُضاف بضع قطرات من الصبغة.

2– يُعامل المحضر بعد ذلك بمزيج (حمض – كحول) لمدة دقيقة واحدة. ويُغسل بالماء العادي ويجفف بورق النشاف.

3– يُعامل المحضر بمحلول النيغروزين المائي ويُترك الأخير ليجف بحيث يتشكل غشاء فوق المحضر .

النتيجة :

تبدو الخلايا الإعاشية (الخضرية) بدون لون ، أما الأبواغ الداخلية فتصبغ بلون أحمر ، أما خلفية المحضر فتظهر سوداء اللون.

صبغ الأشكال الساكنة Cystes :

بالإضافة إلى الأبواغ الداخلية Endospores ، لوحظ أن بعض البكتريا كما هو الحال عند الـ *Azotobacter* على سبيل المثال وجود أشكال ساكنة أخرى، تتشكل

عند شُح مصادر الغذاء. وهي عبارة عن خلايا كروية مكتنزة، تسمى بـ Cystes ، مقاومة للجفاف ، والمؤثرات الميكانيكية ، لكنها ليست مقاومة للحرارة المرتفعة.

صبغ الأبواغ الساكنة Cystes عند الـ *Azotobacter*

إن هذه الطريقة حسب ما يصفها (Vela, Wyss, 1964) لا تصلح فقط لإظهار Cystes الأزوتوبكتر وإنما أيضاً الأشكال الإنتقالية الأخرى قبل اكتمال تشكل الـ Cystes.

المواد والأدوات اللازمة : يحضرّ الخليط التالي :

حمض الخل الجليدي	8.5 مل
سلفات الصوديوم اللامائية	3.25 غ
الأحمر المعتدل	200 ملغ
الأخضر الزاهي S.F المصفر	200 ملغ
إيتانول 95 %	50 مل
ماء مقطر	100 مل

تضاف كل الصبغات والمواد الكيميائية السابقة إلى الماء مع التحريك المستمر لمدة (15) دقيقة. ثم يرشّح الخليط من خلال فلتر قطر ثقوبه ٥.. ميكروميتر.

الطريقة :

1- توضع قطرة ماء على شريحة زجاجية نظيفة وخالية من الدهون. وبواسطة الإبرة اللاقحة توضع عينة الآزوتوباكتر وتمزج مع قطرة الماء بشكل جيد.

2- يضاف الخليط السابق فوق العينة ثم توضع فوقها الساترة ويتم المشاهدة تحت عدسة المجهر.

النتيجة:

أ- ستبدو خلايا الآزوتوباكتر الإعاشية بلون أخضر مصفر .

ب- أما المراحل المبكرة من الـ Cystes غير مكتملة التكوين فسيكون لون السيتوبلاسم أخضر معتم ، يفصل بينها وبين الجدار الخلوي طبقة بنيّة محمرة.

جـ- تظهر الCystes مكتملة النمو على الشكل التالي : الجزء المركزي يكون بلون أخضر معتم ، تليها طبقة غير ملونة ، أما الجزء الخارجي منها فسيبدو بلون بني محمر .

4- صبغ المحفظة (الكابسولة):

تشكل بعض الأنواع من البكتريا في ظروف استنبات خاصة محافظ .

عند صبغ المحافظ بالطرق العادية (الصبغ البسيط) تبقى بدون لون، ولإظهارها تستخدم عادة طرق تلوين خاصة تسمى بالصبغ السلبي . وستبدو المحفظة بشكل أفضل عند اتباع طريقة تجهيز محضرات الخلايا الحية (الرطبة)، ذلك لأن عملية تجفيف وتثبيت المحضر يمكن أن تقود إلى تخريب بنية المحفظة .

المواد والأدوات اللازمة:

مزارع بكتيرية تحوي خلايا مشكلة للمحافظ، حبر، المجهر ومستلزمات الفحص المجهري.

الطريقة:

1- توضع على شريحة زجاجية نظيفة ، قطرة من الحبر وتمزج مع العينة البكتيرية المراد دراستها، وتُغطى بالساترة الزجاجية .

2- تُضْغَط الساترة على الشريحة الزجاجية بواسطة قضيب زجاجي (برفق) حتى ظهور طبقة رقيقة من السائل بين الساترة والشريحة الزجاجية، ثم يُشاهد المحضر بالعدسة الغاطسة، بعد وضع قطرة من زيت الأرز، عندها تظهر المحافظ شفافة.

صبغ المحافظ بطريقة انطونيو Anthony's Method :

المواد والأدوات اللازمة:

محلول سلفات النحاس، مزارع بكتيرية تحوي خلايا مشكلة للمحافظ، المجهر ومستلزمات المجهر.

الطريقة :

1- تؤخذ عينة من المزرعة البكتيرية المراد دراستها ، وتوضع على شريحة زجاجية نظيفة سبق أن وضع فيها قطرة من الماء.ويجُهزالغشاء ويُجفف في الهواء فقط.

2- يُصبغ المحضر بمحلول سلفات النحاس ($CuSO_4.5H_2O$: %20) (وزن/حجم) ثم تُزال الكمية الزائدة من سلفات النحاس، ويجفف المحضر ، ويُشاهد بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز.

النتيجة :

تظهر المحافظ بلون أزرق فاتح . أما الخلايا فتظهر بلون بنفسجي غامق .

5 – صبغ السياط البكتيرية Flagella Staning :

السياط البكتيرية عبارة عن تشكيلات رفيعة جداً (0.02–0.04 ميكرومتر). وهذا ما يجعل كشفها أمراً صعباً. ولما كان ثخن السياط البكتيرية رفيعاً للغاية فإنه لا يمكن رؤيتها بالمجهر الضوئي. ولذلك تعتمد طرائق تلوينها على أساس معاملتها بداية بمواد تؤدي إلى زيادة ثخنها وذلك لتصبح مرئية بالمجهر الضوئي .

في الواقع إن عملية صبغ السياط تحتاج إلى كثير من الصبر والدقة والخبرة.

تحضير البكتريا قبل الصبغ: يُنصح قبل صبغ السياط القيام بعملية إعادة الزرع* للمزارع البكتيرية لعدة أيام متوالية ، وذلك للحصول على بكتريا فتية لأن البكتريا القديمة غالباً ما تفقد سياطها. وفي اليوم الذي تجري فيه مشاهدة السياط ، يؤخذ بواسطة الماصة المعقمة (في حال المزارع السائلة) أو الإبرة الاقحة المعقمة (في حال المزارع الصلبة) كمية من الكتلة البكتيرية (أو المعلق البكتيري) لتوضع في أنبوب اختبار يحوي على(5–6) مل ماء عادي معقم ، درجة حرارته حوالي (٣٧) م و لا ينصح بتحريك الماصة أو الإبرة في ماء الأنبوب، إنما تُترك الكتلة البكتيرية لتتوزع لوحدها خلال (30–60) دقيقة.

من الضروري قبل البدء بخطوات صبغ السياط، القيام بعملية اختبار الحركة للخلايا مستخدمين طريقة القطرة المعلّقة ، وفي حال ملاحظة انعدام حركة البكتريا، يُترك أنبوب الاختبار في الحاضنة لمدة (1.5–2) يوم عند (٣٧°)م.

*** تجري عملية إعادة الزرع بنقل مزارع بكتيرية بالإبرة اللاقحة من أنبوب الآجار المائل إلى أنبوب الآجار المائل الآخر. ثم التحضين عند درجة حرارة مناسبة لعدة أيام (حسب النوع المدروس، والبيئة المستخدمة).وذلك قبل إجراء الجلسة العملية بعدة أيام .**

كما ينبغي أن تكون الشرائح الزجاجية المستخدمة نظيفة تماماً، من أجل ذلك تُغلى الشرائح بمحلول من بيكربونات البوتاسيوم في حمض الكبريت الكثيف، ومن ثم تُغسل مرتين بمحلول الصودا الكاوي، بعدها تُغسل بالماء المقطر و تُحْفَظ في عبوة زجاجية تحتوي على كحول ٩٦% وقبل تجهيز اللطاخة (الغشاء) ينبغي تسخين الشريحة الزجاجية بشدة من الجانب الذي ستوضع عليه العينة . ومن البديهي عدم استخدام الشرائح إلا بعد أن تبرد .

صبغ السياط بطريقة موروزوف :

تحضّر المحاليل الثلاثة التالية :

المحلول أ – مكوّن من:	حمض الخل الجليدي	1 مل
	فورمالين	2 مل
	ماء مقطر	100 مل
المحلول ب – مكوّن من:	تانين	5 غ
	حمض الكربوليك	1 مل
	ماء مقطر	100 مل

المحلول حـ – مكون من :

5 غ نترات الفضة الكريستالية ($AgNO_3$) المذابة في 100 مل ماء مقطر. يُؤخذ منه (80) مل، ويُصب إليه قطرة قطرة من محلول النشادر المائي ، حتى يذوب الراسب المتكوّن ويصبح برّاقاً . يُخفف محلول الفضة بالماء المقطر بنسبة (1: 100) وذلك لاستخدامه عند صبغ المحضر .

الطريقة :

1- يُعامل المحضر لدقيقة واحدة بالمحلول (أ) ثم يغسل بالماء .

2- يُعامل المحضر بالمحلول (ب) مع التسخين الخفيف لمدة دقيقة واحدة حتى ظهور البخار . يُغسل بعدها المحضر بالماء بشكل جيد .

٣- يُعامل المحضر لمدة (1-2) دقيقة مع التسخين بالمحلول (حـ) وذلك حتى يصبح لون اللطاخة بني غامق. يُغسل بعد ذلك المحضر بالماء، ويجفف، ويشاهد بالعدسة الغاطسة للمجهر.

صبغ السياط بطريقة ليفسون Leifson's Method :

1- تُنمى البكتريا في أنابيب اختبار الآجار المائل ويُعاد زرعها بالطريقة المشروحة آنفاً وذلك للحصول على خلايا فتيّة (انظر تحضير البكتريا قبل الصبغ).

2- تحضّر صبغة ليفسون Leifson's stain المكونة من :

20 مل $NH_4Al(SO_4)_2\ 12H_2O$ محلول مشبع

حمض التانيك محلول بالماء بنسبة ٢٠%

10 مل ماء مقطر

15 مل كحول إيتيلي 95%

3 مل فوكسين (محلول مشبع في كحول 95 %)

تضاف المواد بالترتيب السابق وتحضر قبل الاستعمال مباشرة .

3- يؤخذ بالإبرة الاقحة قطرة من المعلّق البكتيري وتوضع على شريحة زجاجية وتوزع على مساحة $4Cm^2$.

4- يوضع على الغشاء (اللطاخة) (1 مل) من صبغة ليفسون وتترك حوالي (7-15) دقيقة .

5- تُغسل الصبغة بالماء العادي بهدوء ، ويجفف المحضر بالهواء .

6- يفحص المحضر بالغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز .

النتيجة :

تظهر البكتريا والسياط بلون أحمر .

6- صبغ المادة النووية البكتيرية :

يتم الكشف عن المواد النووية عن طريق إجراء التفاعل للحمض داي أوكسي ريبونيوكلييك DNA ، الذي يدخل في تركيب النيكليوتيدات (بروتين نووي معقد). وأهم الطرق المستخدمة لصبغ الـDNA هو إجراء تفاعل فولجين Feulgen.

ومبدأ الطريقة يتمثل في أنه عند تعرض النيكليوتيدات النووية للحلمهة بواسطة محلول مخفف من حمض، يحدث تفكك للأسس البيورينية Purines والبيريميدينية Pyrimidines، مما يقود إلى تحرير داي أوكسي ريبوز الداخل في تكوين الـDNA. وعند حلمهة داي أوكسي ريبوز يتحول إلى ألدهيد الذي يتفاعل بدوره مع الجزء الكبريتي من كاشف شيف عديم اللون ، ويتحرر بالتالي الفوكسين ذو اللون الأحمر، وتصبح المواد النووية بالنتيجة ملوّنة .

المواد والأدوات اللازمة:

مزارع بكتيرية؛ مثبت كارنوا؛ محلول ١ نظامي من HCl؛ كاشف شيف، محلول مائي من H_2S؛ أوعية زجاجية؛ مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة:

1- تُجهز لطاخة (غشاء) من العينة المدروسة وتُجفف.

2- يُعامل المحضّر بالمثبت كارنوا لمدة (5) دقائق، يُغسل المحضر بعد ذلك بالكحول المطلق.

3- يُعامل المحضر لمدة (1-2) دقيقة بمحلول 1-نظامي من HCl المسخّن حتى (٦٠ ْ م).

4- يعامل المحضر لمدة (3-4) ساعة بواسطة كاشف شيف .

5- يعامل المحضر وبشكل متتالي في ثلاثة أوعية تحوي محلول مائي من H_2S ولمدة (20) دقيقة في كل وعاء .

6 - يجفف المحضر ويُشاهد تحت المجهر بالعدسة الغاطسة .

النتيجة :

تصبغ المادة النووية بلون بنفسجي .

المحاليل المستخدمة :

- مثبت كارنوا ، يتكون من: كحول مطلق و كلوروفورم و حمض الخل بنسبة 6: 3: 1 على التوالي .

- كاشف شيف : مكون من 1 غ من الفوكسين و (350-400) مل من الماء المقطر المسخن بحدود (٧٠ ْم). بعد تبريد المحلول السابق يُقَرقر فيه غاز بلا ماء حمض الكبريتي حتى يصبح المحلول عديم اللون أو ذا لون أصفر باهت . وبعد ذلك يجري تمديد الكمية السابقة إلى الليتر.

7- صبغ المدخرات السيتوبلاسمية :

لبعض الكائنات الحية الدقيقة القدرة على ادخار مواد غذائية ، عضوية وغير عضوية ويتعلق ذلك بالظروف البيئية والفيزيولوجية للخلية . وتستعمل هذه المدخرات في إنتاج الطاقة اللازمة للخلية .

المواد والأدوات اللازمة:

مزارع بكتيرية مناسبة؛ فوكسين كربولي؛ أزرق الميتيلين؛ محلول البوتاسيوم؛ السودان الأسود B، الكسيلول، صبغة الصفرانين.

أ- صبغ الفوليوتين Volutine (حبيبات ميتا كروماتينية) :

الفولوتين: عبارة عن فوسفات متعددة. وهي مواد فوسفورية وآزوتية ادخارية مشتقة من الأحماض النووية . اسْتُفيد بالماضي من طريقة صبغ الفولتين للأغراض التشخيصية. وخاصة في حالة *Corynebacteryum diphertеriae* .

الطريقة :

1- يجهز المحضر على شريحة زجاجية كالمعتاد . ويصبغ بالفوكسين الكربولي لمدة (0.5-1) دقيقة .

2- يغسل المحضر بالماء. ويصبغ لمدة (20-٣٠) ثانية بأزرق الميتيلين. يُغسل بعدها المحضر ويجفف ويُشاهد بالعدسة الزيتية الغاطسة .

النتيجة :

تبدو حبيبات الفولين بلون أحمر، بينما السيتوبلاسم بلون أزرق .

- يمكن أيضاً الكشف عن الفولتين بصبغ المحضر لمدة (10-30) ثانية بأزرق الميتيلين . عندها تبدو حبيبات الفولوتين بلون يتراوح بين الأزرق والبنفسجي .

- كما يمكن الكشف عن الفولتين بصبغ المحضر بمحلول أزرق التولودين ١%. من ثم يُغسل المحضر بالماء ويُجفف بورق النشاف ويشاهد. عندها تصبغ حبيبات الفولتين بلون أحمر في حين تلوّن السيتلوبلاسم بلون أزرق فاتح.

ب – صبغ الغليكوجين :

الغليكوجين : نشاء حيواني ، غالباً ما يتراكم في خلايا الخمائر والأنواع التابعة للجنس *Bacillus*. ولإشباع خلايا الخمائر بالغليكوجين، يتم تنميتها في بيئة تحوي مرق الشعير، الذي يعتبر مصدراً غنياً بالكربوهيدرات. ويظهر الغليكوجين في حال كانت خمائر *Saccharomyces cervisiae* و *Bacillus mycoides* بعمر لا يتجاوز اليومين.

الطريقة :

1- يحضّر معلّق من *Saccharomyces cervisiae* و *Bacillus mycoides*.

2- يوضع على الشريحة الزجاجية النظيفة قطرة من المعلّق ويضاف إليه قطرة من محلول يود البوتاسيوم (7 غ يود و 20غ يودات البوتاسيوم إلى 100-300 مل ماء مقطر).

3- توضع الساترة الزجاجية ، ويُزال السائل الزائد حولها بورق الترشيح . ويُشاهد بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز على الساترة .

النتيجة :

يبدو الغليكوجين بألوان تتراوح بين بني مصفر و بني غامق .

في حال مشاهدة محضر من خمائر *Saccharomyces cervisiae* يمكن ملاحظة الخلايا المتبرعمة، حيث تكون الخلية مكتنزة بالغلوكوجين في حين تبدو الخلية البنت (البرعم) عديمة اللون تقريباً وذلك لقلة محتواها من الغليكوجين .

حـ – صبغ الغرانولاز :

الغرانولاز : عبارة عن كربوهيدرات ، مشابهة للنشاء ، تتراكم بكميات كبيرة في بكتريا حمض الزبدة *Clostridium butyricum* قبل التبوّغ .

الطريقة :

1- يوضع على شريحة زجاجية قطرة من معلّق يحوي بكتريا حمض الزبدة* *Clostridium butyricum* .

2- يضاف قطرة من محلول ليوغول .

3- توضع الساترة الزجاجية ويُزال السائل الزائد بواسطة ورق الترشيح، ويُشاهد المحضر بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز على الساترة .

النتيجة :

أ- تبدو خلايا *Clostridium butyricum* حية عصوية صغيرة ، متحركة لأن محلول ليوغول لا يقتلها .

ب- تظهر الخلايا بشكل قاربي نتيجة وجود الأبواغ في مركز الخلية ، حيث يكون قطر الأبواغ أكبر من قطر الخلايا (انظر طريقة صبغ الأبواغ) .

حـ- يصبغ محلول ليوغول الغرانولاز بلون بنفسجي مزرق ، و في العادة يتوضع الغرانولاز قريباً من طرف الخلية مُخْتَلاً عند بعض الخلايا القسم الأكبر منها .

*** يتم الحصول على معلّق يحوي *Clostridium butyricum* على النحو التالي : تقطع البطاطا غير المغسولة قطعاً صغيرة، وتوضع في أنبوب اختبار، يُضاف إليها قليل من $CaCO_3$. ويملأ الانبوب إلى ثلثيه بماء الصنبور . ثم يوضع في حمام مائي عند (٨٠°م) لمدة (10) دقائق. بعد ذلك يحضّن عند (٣٠)مْ لمدة (2-3) يوم. يحوي المعلّق الناتج على بكتريا *Clostridium butyricum* .**

د- صبغ حمض بولي بيتا هيدروكسي بيوترك Acide poly-B-hydroxy butyric :

لبعض الأجناس البكتيرية القدرة على ادخار مواد كربونية ، ذات طبيعة دهنية كالبولي بيتا هيدروكسي بيوتريك . ولإظهار هذا الحمض تتبع الطريقة التالية:

الطريقة :

1- تُجهز اللطاخة كالمعتاد، وتُعامل بمحلول من السودان الأسود B ٠.٣% (يحضّر في ٧٠% من الكحول الإيتيلي) مجهز حديثاً لمدة (5-15) دقيقة .

2- تُسكب الصبغة عن المحضر ويُجفف في الهواء ويُغسل بالكسيلول، لعدة مرات، ولفترة لاتزيد على الدقيقة الواحدة . ثم يجفف المحضر بمادة ماصة للكسيلول.

3- يصبغ المحضر بالصبغة الإضافية الصفرانين المائي (0.5%) لمدة (5-10) ثوانٍ. ثم تغسل الشريحة الزجاجية بالماء العادي وتُشاهد تحت المجهر .

النتيجة :

يظهر حمض بولي هيدروكسي بيوتريك على شكل نقاط صغيرة زرقاء مسوّدة. في حين تُصبغ السيتوبلاسم بلون وردي .

الفصل السابع

الفطـريات

تشغل الفطريات موقعاً هاماً بين الأحياء الدقيقة، وهي تضم مجموعة كبيرة من الكائنات حقيقية النوى Eukaryotic، لا تحوي الفطريات على الكلوروفيل وتسلك طرقاً مختلفة للحصول على غذائها، بعضها رميّ Saprophytic يتغذى على بقايا الكائنات الأخرى، وبعضها متطفل Parasitic على النبات أو الحيوان أو الإنسان مسبباً بذلك أمراضاً ذات أهمية اقتصادية. كما أن للفطريات فوائد عدة؛ حيث تدخل في صناعات مختلفة مثل صناعة الخبز وإنتاج الحموض العضوية والكحولات والفيتامينات والمضادات الحيوية وغيرها، وتستخدم بعض الفطريات في التغذية كالكمأة والفطر الزراعي.

الفطريات كائنات بسيطة التركيب فهي إما أن تكون وحيدة الخلية مثل الخمائر Yeasts أو خيطية Filamentous مثل فطريات الأعفان Molds حيث يكون جسم الفطر مكوناً من خيوط عديدة متشابكة تدعى الميسليوم Mycelium. الخيط الواحد من الميسليوم يسمى هيفا Hypha.

عزل الفطريات Isolation of Fungi

تنتشر الفطريات في الماء والتربة وغيرها من الأوساط، وتوجد أبواغها في الهواء. كما تعيش على المواد العضوية المختلفة الموجودة في البيئة . تنمو معظم الفطريات ببطء مقارنة مع البكتريا ، وتتمتع الفطريات (بما فيها الخمائر) بمدى حراري وغذائي واسع فبعضها يستطيع النمو عند درجات حرارة تقرب من الصفر المئوي وهذا يُفسر فساد المواد المخزونة في مستودعات التبريد بفعل بعض هذه الفطريات، إلا أنّ الدرجة المثلى لنمو معظم الفطريات الرميّة تتراوح بين ٢٢- ٣٠ م .

كما تنمو الفطريات على أوساط مغذية تحوي نسبة عالية من السكر تكفي لتثبيط نمو البكتريا، وهذا يفسر فساد المربيات بفعل فطريات العفن .

يتم عزل الفطريات بطرق مختلفة تتناسب ومكان وجودها وطريقة معيشتها، حيث يمكن تنمية **الفطريات الرمية** مخبرياً على أوساط مغذية خاصة أهمها: وسط Sabouraud's Agar الذي يتكون من ١٠% بيتون؛ ٤% غلوكوز؛ ٢% آجار. تضبط حموضة الوسط عند pH=6 من أجل إعاقة نمو معظم أنواع البكتريا.

هناك بعض أنواع الفطريات التي لا يناسبها وسط Sabouraud's Agar نظراً لانخفاض درجة حموضته وارتفاع تركيز السكر فيه، والوسط الأكثر ملاءمةً لنمو مثل تلك الأنواع الفطرية هو وسط يحوي: ٢% غلوكوز؛ ١% بيتون ويجب أن تضبط حموضة الوسط عند (٦,٨– ٧). ولتثبيط نمو البكتريا (منع التلوث البكتيري) في الوسط يتم إضافة ٤٠ ملغ من المضاد الحيوي كلورا مفينكول لكل ١ ليتر من الوسط المغذي.

ومن الأوساط شائعة الاستخدام في عزل الفطريات وسط بطاطا دكستروز آجار Potato Dextrose Agar إضافة للأوساط العامة السابقة، هناك أوساط خاصة تستخدم عند دراسة وتنمية أنواع خاصة من الفطريات مثل وسط تشابك (Czapek Solution Agar) .

أما **الفطريات إجبارية التطفل** فيتم عزلها عن طريق تنميتها على كائنات حية بعدة طرق؛ أهمها طريقة إجراء العدوى الاصطناعية، ومثال ذلك عزل فطريات البياض الدقيقي و الأصداء و التفحمات (وهي فطريات ممرضة للبنات، إجبارية التطفل) حيث يتم إجراء العدوى الاصطناعية على نباتات حساسة مزروعة في أصص موجودة في بيت زجاجي وذلك لضبط كافة العوامل البيئية المناسبة لنمو الفطر، وعند اقتراب النبات المصاب من الموت يُعاد إجراء العدوى على نباتات جديدة وذلك للاحتفاظ بعزلات حيّة من الفطر داخل المختبر.

(سيتم تناول طرق عزل الفطريات إجبارية التطفل بالتفصيل في مقررات لاحقة)

الأدوات والمواد اللازمة:

– ثمار فاكهة متعفنة، عينات من تربة زراعية مأخوذة من عمق ١٥- ٢٠ سم

- أطباق بتري معقمة

- وسط بطاطا دكستروز آجار (PDA) معقم ومصهور وموضوع في حمام مائي مضبوط عند الدرجة ٥٠مْ.

طريقة العمل :

١- يُنثر مقدار ٤٠ ملغ من تربة زراعية جافة في قعر طبق بتري معقم بعد تدوين البيانات الخاصة عليه.

٢- يُصب الوسط المغذي في الأطباق المعقمة الفارغة وكذلك في الطبق الحاوي على التربة وتحرك الأطباق على سطح مستو حركة رحوية بسيطة، وتُترك حتى يتصلب الوسط.

٣- يُعرض أحد الأطباق الحاوية على الوسط المغذي لجو المخبر، وذلك برفع غطاء الطبق مدة ٣٠ دقيقة ثم يتم إغلاقه (تدون عليه البيانات الخاصة)

٤- يتم تلقيح أحد الأطباق الحاوية على الوسط المغذي بذرّ قطع صغيرة من قشور الفاكهة فوقها وتدوّن عليه البيانات الخاصة.

٥- تُحضن الأطباق السابقة عند درجة حرارة ٢٥ م حتى موعد الجلسة العملية التالية.

٦- بعد انتهاء فترة التحضين يتم فحص الأطباق، والتعرف على بعض أجناس الفطريات من خلال شكل ولون مستعمراتها بمساعدة المشرف على الجلسة العملية .

٧- دوّن في دفترك الخواص المزرعية لبعض الأجناس المنتشرة في الأطباق مثل: *Aspergillus* ، *penicillium* ، *Alternaria* ، *Rhizopus*

طرائق تجهيز المحضرات المجهرية الفطرية :

تختلف طرائق تجهيز المحضرات المجهرية للفطريات **إجبارية التطفل** (التي لايمكن تنميتها على أوساط مغذية صناعية غالباً) باختلاف مكان تطفل الفطر ووجود بنياته المميزة . يتم فحص تلك الفطريات مباشرة من الأنسجة المصابة بعدة طرق :

– **الكشط** : وتستخدم في حال الفطريات سطحية التطفل مثل البياض الدقيقي حيث يتم نقل بُنيات الفطر من سطح النسيج المصاب إلى شريحة زجاجية نظيفة تحوي قطرة من الصبغة دون المساس بالنسيج النباتي المصاب.

– **السلخ** : وتستخدم في حال الفطريات التي تتطفل داخليا على النبات ثم ترسل حواملها البوغية المميزة خارج النسيج النباتي عبر المسام والعدسات، وتتم الطريقة بسلخ بشرة النسيج النباتي المصاب ونقلها إلى شريحة زجاجية تحوي قطرة من الصبغة، وتستخدم هذه الطريقة في فحص الفطريات المسببة لأمراض البياض الزغبي.

– **المقاطع** : وتستخدم هذه الطريقة في حال تغلغل الفطر ضمن الأنسجة المصابة (بين الخلايا أو داخلها) وتتم الطريقة بإجراء مقطع عرضي في النسيج النباتي المصاب باستخدام شفرة حادة أو مشرط حاد، على أن يكون المقطع رقيقاً ما أمكن. ثم نقل المقاطع إلى شريحة زجاجية نظيفة تحوي قطرة من الصبغة.

ملاحظة :

في الحالات الثلاث السابقة يتم تغطية الشريحة الزجاجية بساترة نظيفة ثم الضغط عليها بلطف بواسطة طرف الإبرة اللاقحة أو الحربة، للتخلص من الفقاعات الهوائية ومباعدة بنيات الفطر. ثم تُفحص المحضرات المجهرية باستخدام العدسات الشيئية الجافة ذوات التبكير x١٠، x٤٠

أما بالنسبة **للفطريات الرميّة** التي يمكن تنميتها على أوساط مغذية صناعية، فيتم فحصها مباشرة بأخذ جزء من النمو الفطري إلى شريحة نظيفة تحوي قطرة من الماء (القطرة الرطبة) ثم تغطيتها بساترة زجاجية نظيفة وفحصها مجهرياً عند التكبيرات x١٠، x٤٠.

يُعاب على طريقة فحص الفطريات بطريقة القطرة الرطبة عدم وضوح الأبواغ وهذه الأخيرة تعتبر مهمة في تعريف الفطريات عموماً، كما أن هذه الطريقة تؤدي إلى تكسر الحوامل البوغية وتشويه الأبواغ عند نقل الهيفا إلى الشريحة الزجاجية، مما يجعل عملية تعريف الفطر أمراً صعباً.

سنتناول فيما يلي طريقة تجهيز محضر فطري من مزرعة فطرية دون الإضرار ببنيات الفطر، ثم صبغه مباشرة على الشريحة الزجاجية.

الأدوات والمواد اللازمة :

- طبق بتري، شرائح زجاجية وساترات.
- ورق ترشيح معقم بقطر ٩ سم.
- قضيب زجاجي معكوف على شكل U.
- طبق بتري يحوي مزارع فطرية مختلطة.
- طبق بتري يحوي وسط Sabouraud's Agar.
- مشرط، إبرة لاقحة ذات العقدة ، ماء مقطر.
- صبغة اللاكتوفيتول مع أزرق القطن.

طريقة العمل: (الشكل-٣٣)

١- خذ بواسطة ملقط معقم ورقة ترشيح معقمة وضعها في قعر طبق بتري معقم.
٢- ضع فوق الورقة القضيب الزجاجي المعكوف U باستخدام ملقط معقم (يمكن تعقيم القضيب الزجاجي بالتلهيب) .
٣- ضع كمية كافية من الماء المقطر (حوالي ٤ ملم) على ورقة الترشيح لترطيبها بشكل كافٍ.
٤- بواسطة ملقط معقم ضع شريحة زجاجية معقمة فوق القضيب الزجاجي المعقوف.
٥- عقم المشرط بالتلهيب واقتطع بواسطته مكعباً صغيراً طول حرفه حوالي ٥ ملم من وسط Sabourud's Agar

٦- انزع قطعة الأجار المكعبة الشكل من الطبق وذلك بغرس المشرط في أحد أطراف المكعب ثم لقح القطعة المكعبة من الوسط المغذي من أعلاها وأسفلها بأبواغ الفطر المأخوذة من مستعمرة فطرية (تأكد من تعقيم وتبريد المشرط والإبرة اللاقحة قبل استخدامها).

٧- ضع قطعة وسط Sabourud's Agar السابقة الملقحة وسط الشريحة الزجاجية بحيث يلامس زجاج الشريحة أحد وجهي القطعة المكعبة الملقحين.

٨- ضع سائرة زجاجية معقمة فوق الوجه الآخر الملقح لقطعة الآجار السابقة.

٩- ضع الغطاء فوق طبق البتري ثم حضنه عند درجة حرارة المخبر مدة ٤٨ ساعة.

١٠- افحص الشريحة قبل تجهيز المحضر المجهري عند التكبيرات الضعيفة للمجهر، وإذا لم تلاحظ نمواً في الهيفات وتشكيل أبواغ تابع التحضين لمدة ٢٤–٤٨ ساعة أخرى.

١١- إذا لاحظت نمواً للأبواغ والهيفات باشر بعمل (تجهيز) المحضر المجهري كما يلي:

المواد والأدوات اللازمة :

- شرائح وساترات زجاجية للفحص المجهري .
- كحول إتيلي ٩٥ % .
- صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن.
- ملاقط .

طريقة العمل :

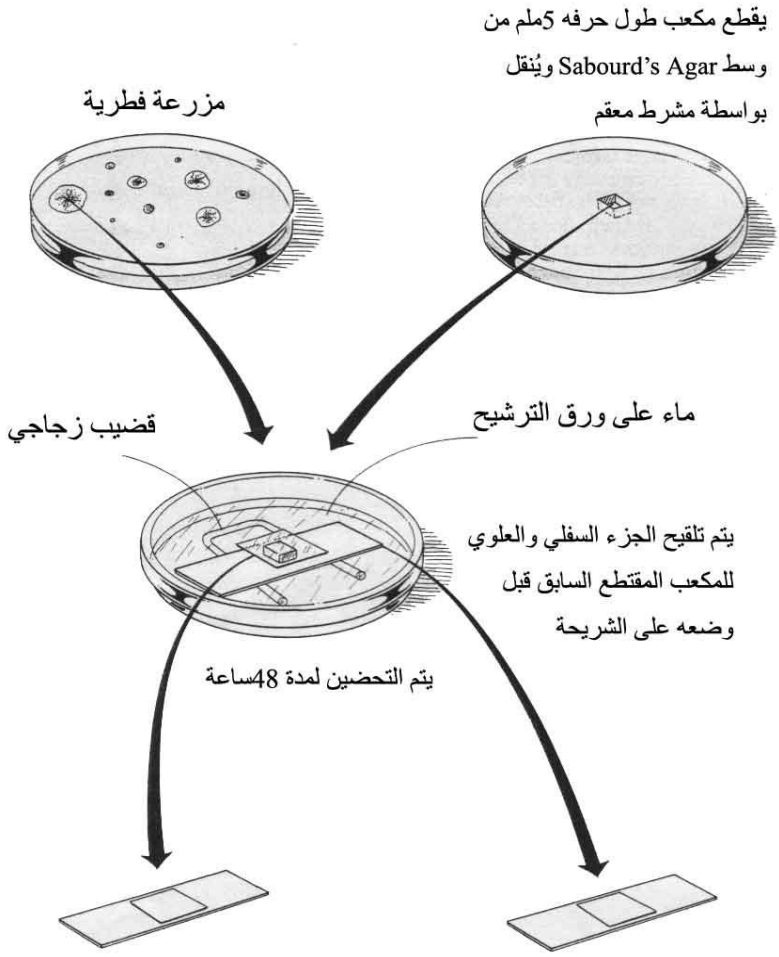
١- ضع قطرة من الصبغة وسط شريحة زجاجية نظيفة.

٢- بواسطة الملقط، انزع الساترة الزجاجية التي تغطي قطعة الآجار ثم استبعد قطعة الآجار.

٣- ضع قطرة من الكحول الاتيلي ٩٥% على هيفات الفطر الموجودة على الساترة، وحالما تجف قطرة الكحول ضع الساترة الزجاجية فوق الشريحة الزجاجية التي تحوي قطرة من الصبغة في وسطها. وبذلك يكون المحضر الفطري جاهزاً للفحص المجهري.

٤- ارفع الشريحة الزجاجية الموجودة في طبق البتري وضعها جانباً ثم أضف إلى هيفات الفطر الموجودة على الشريحة قطرة من الكحول الإيتيلي ٩٥% وأتبعها بقطرة من الصبغة، ثم غط الشريحة السابقة بساترة زجاجية نظيفة لتحصل على محضر فطري آخر جاهز للفحص المجهري.

٥- افحص المحضرين السابقين تحت عدسة المجهر واختر أفضلهما لدراسته.



(الشكل-٣٣) مراحل عمل محضر فطري من مزرعة فطرية

تصنيف الفطريات **Classification of Fungi**

وضع العالم Alexopoulas (١٩٩٦) الفطريات في ثلاث ممالك رئيسة هي:

مملكة : Kingdom: Protista

مملكة : Kingdom: Stramenopila

مملكة الفطريات : Kingdom: Fungi

وفيما يلي أهم الشعب Phylum التابعة لتلك الممالك مع إلقاء الضوء "سريعاً" على أهم الأجناس التابعة لها.

الفطريات التابعة لمملكة **Kingdom Protista**

يتبع هذه المملكة شعبة: **phylum: *Plasmodiophormycota***

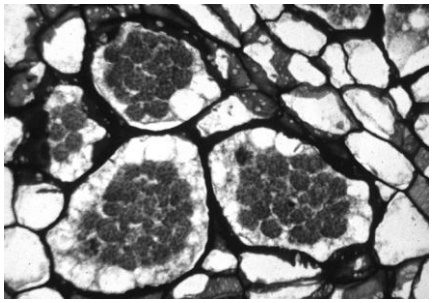
تضم هذه الشعبة فطريات تجمع بين صفات الأوليات وبعض صفات الفطريات، حيث يكون طورها الخضري على هيئة كتلة برتوبلازمية عديدة الأنوية غير محاطة بجدار خلوي، وهي تشبه في شكلها وحركتها وتغذيتها الأميبا. ويُسمى جسم الفطر عندئذ Plasmodium. في حين أنها تُشكل في أحد مراحل تطورها وتكاثرها أبواغاً هدبية سابحة Zoospores وهي بذلك تشبه الفطريات .

تسبب بعض تلك الفطريات أمراضاً للنبات مثل جنس *Plasmodiophora* الذي يتطفل على جذور نباتات العائلة الصليبية مسبباً مرض الجذر الصولجاني .

طريقة العمل :

استعن بمحضر مجهري جاهز وافحصهُ عند التكبير x٤٠

ولاحظ : (الشكل-٣٤)



Plasmodiophora sp (الشكل-٣٤)

- إن الفطر لا يمتلك بنية نسيجية خيطية، وإنما هو كتلة غير محددة الشكل تملأ خلايا النبات المصاب.

- أن الخلايا النباتية المصابة أكبر حجما وذات شكل مشوّه مقارنة بالخلايا السليمة.

ارسم ما تشاهده في دفترك.

الفطريات التابعة لمملكة **Kingdom Stramenopila**

تضم هذه المملكة **شعبة الفطريات البيضية *Oomycota* :phylum**: تمتلك الفطريات البيضية بنية خيطية كما في حال الفطريات الحقيقية، إلا أن جدرها الخلوية تمتاز بوجود السللوز والجلوكونات وغياب الكتين. الهيفا غير مقسمة .

تمتاز الأنواع التابعة لهذه الشعبة بالتنوع الكبير من حيث نمط ومكان معيشتها، فبعضها إجباري التطفل وبعضها الآخر إجباري الترمم، كما أن بعضها يعيش في الأوساط المائية وبعضها الآخر على اليابسة. تتكاثر لاجنسياً بالأبواغ الكونيدية والهدبية السابحة وجنسياً بتشكيل البوغة البيضية Oospore.

يتبع لشعبة الفطريات البيضية أجناس عدة أهمها تلك المسببة لأمراض البياض الزغبي Douny Mildews وهي كائنات إجبارية التطفل تصيب محاصيل مختلفة محدثة فيها أمراضاً وخسائر كبيرة، ومثالها الفطر المسبب لمرض البياض الزغبي على الخس *Bremia lactucae* الذي يتم التعرف عليه على النحو التالي:

المواد والأدوات اللازمة:

أوراق خس مصابة بمرض البياض الزغبي؛ حربة أو إبرة مستقيمة؛ ملقط ذو رأس دقيق؛ صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن؛ المجهر ومستلزمات العمل المجهري.

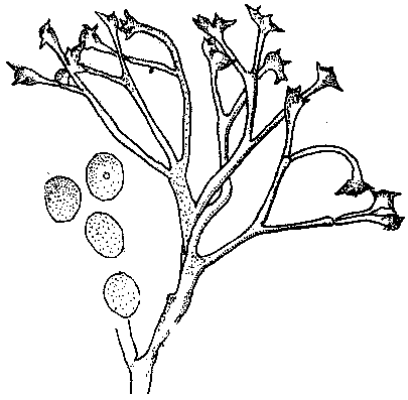
طريقة العمل:

١- استعن بأوراق خس مصابة واعمل سلخاً في البشرة السفلى للأوراق في منطقة الإصابة مستخدماً ملقطاً برأس دقيق (يستدل على مكان الإصابة من وجود نمو زغبي أبيض كثيف على الوجه السفلي للورقة يقابلها بقع صفراء باهتة على الوجه العلوي للورقة).

٢- ضع الجزء المسلوخ على شريحة زجاجية نظيفة تحوي قطرة من صبغة أزرق القطن مع اللاكتوفينول.

٣- إذا كانت الأوراق جافة، فاعمل على ترطيبها بوضعها بين ورقتي نشاف مبللة بالماء لعدة دقائق، ثم اعمل كشطاً لطيفاً للنموات الزغبية بواسطة إبرة أو حربة وانقلها إلى شريحة نظيفة تحوي قطرة من صبغة أزرق القطن مع اللاكتوفينول.

٤- ضع ساترة زجاجية نظيفة فوق المحضر، واضغط عليها بلطف للتخلص من الفقاعات الهوائية ثم افحص المحضر عند التكبيرات الضعيفة أولاً ثم التكبير x٤٠.



(الشكل–٣٥) ***Bremia lactucae***

لاحظ: (الشكل–٣٥)

- الميسليوم غير مقسم.
- الحوامل البوغية طويلة غير مقسمة تخرج من الثغور التنفسية للورقة وتتفرع في ثلثها الأخير تفرعاً شجيرياً ثنائياً.
- في نهاية التفرع هناك طبقة منتفخة تحمل (٣-٥) زوائد تحمل بدورها الأكياس البوغية للفطر.

ارسم ما تشاهده على دفترك .

الفطريات التابعة لمملكة الفطريات Kingdom Fungi

وتضم:

شعبة الفطريات الكتريدية ***Chytridiomycota*** **Phylum:** : الفطريات التابعة لهذه الشعبة لا تملك ميسليوماً حقيقياً إلا أن جدرها الخلوية تحوي على الكيتين.

تضم هذه الشعبة فطريات تتطفل داخلياً على نباتات عديدة أهمها الجنس *Synchytrium* المسبب لمرض سرطان البطاطا الذي يحدث أوراماً سرطانية على الدرنات تفوق أحياناً حجم الدرنة ذاتها .

جسم الفطر عبارة عن كتلة سيتوبلازمية ذات شكل متغير إلا أنها محاطة بجدار خلوي. ينتشر الفطر بواسطة الأبواغ الهدبية السابحة كما يشكل ضمن النبات أبواغاً ساكنة كروية أو بيضاوية.

طريقة العمل :

افحص محضراً مجهرياً جاهزاً عند التكبير x٤٠ ولاحظ :

- الفطر لا يمتلك ميسليوماً حقيقياً.
- الأبواغ الساكنة كروية الشكل تملأ تجويف خلية النبات المصاب.

ارسم ما تشاهده على دفترك .

شعبة الفطريات الزيجية phylum: *Zygomycota* : الهيفا غير مقسمة، تتكاثر لا جنسياً بتشكيل الأبواغ السبورانجية Sporangiospores وجنسياً بتشكيل الأبواغ الزيجية Zygospores

أهم الأجناس التابعة لهذه الشعبة هو الجنس *Rhizopus sp*. يتبع هذا الجنس أنواعاً رميّة تتسبب في تعفن الخبز إضافة إلى مرض العفن الطري Soft rot على الخضراوات والفاكهة خلال فترة النقل والتخزين خاصة تحت ظروف الرطوبة المرتفعة.

المواد والأدوات اللازمة:

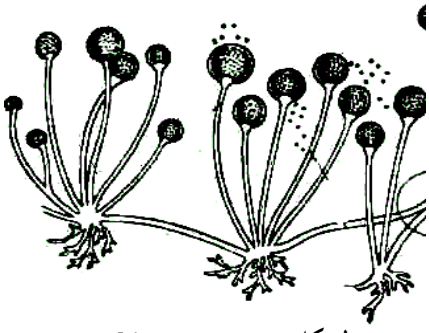
أطباق بتري تحوي مزارع فطرية معزولة من الهواء؛ إبرة مستقيمة وحربة؛ صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن؛ مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

طريقة العمل :

افحص أحد الأطباق الحاوية على مستعمرات فطرية معزولة من الهواء، ولاحظ الشكل المميز لمستعمرات جنس *Rhizopus* والتي تبدو كطبقة لبادية بيضاء كثيفة تعلوها رؤوس سوداء هي عبارة عن الأكياس السبورانجية، ولاحظ أن الحوامل البوغية طويلة قد تصل حتى غطاء الطبق.

جهّز محضراً فطرياً من أحد المستعمرات وذلك بأخذ جزء من النمو الفطري بواسطة إبرتين أو إبرة وحربة، ثم ضعه وسط قطرة من صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن على شريحة زجاجية نظيفة، ثم غطِّ المحضر بساترة زجاجية نظيفة واضغط عليها برفق بطرف الإبرة لإزالة الفقاعات الهوائية ومباعدة بنيات الفطر. افحص المحضر باستخدام العدسة الشيئية الضعيفة x١٠ ولاحظ : (الشكل-٣٦)

- الميسليوم غير مقسم.
- الحوامل البوغية طويلة وغير مقسمة.
- الأكياس البوغية شفافة تشبه القبعة ويمكن بزيادة قوة التكبير مشاهدة الأبواغ السبورانجية داخل الأكياس.
- أشباه الجذور التي تميز هذا الجنس.



(الشكل-٣٦) ***Rhizopus sp***

ارسم ما تشاهده في دفترك

شعبة الفطريات الأسكية: phylum: *Ascomycota*: الهيفا مقسمة بجدر عرضية، وتحوي جدرها عند غالبية الأنواع على الكيتين Chitin.

تتكاثر **جنسياً** بواسطة الأبواغ الأسكية Ascospores التي تتشكل ضمن بنيات خاصة تعرف بالكيس الأسكي (الزق) (ascus – مفرد ، والجمع asci) قد تكون الأكياس الأسكية حرّة، أو ضمن تشكيلات خاصة تسمى الأجسام الثمرية أو الثمار الأسكية Fruiting bodies.

وتتكاثر **لا جنسياً** بعدة طرق تبعاً لنوع الفطر والظروف البيئية فهي إما تتكاثر بالانقسام البسيط أو بالتبرعم Budding كما في الخمائر Yeasts، أو تتكاثر بالتجزئة (التفتت) Fragmentation حيث ينفصل جزء من الخيط الفطري ليعطي فطراً جديداً كاملاً. إلا إن غالبية الفطريات الأسكية تتكاثر لا جنسياً بالأبواغ الكونيدية Conidiospores التي تنشأ من الحامل الكونيدي مباشرة، وتعتبر شعبة الفطريات الأسكية من أوسع و أهم شعب الفطريات لاحتوائها على أنواع ممرضة للنبات مثل

الفطريات المسببة لأمراض: جرب التفاح، العفن البني، العفن الرمادي، البياض الدقيقي وغيرها، كما أن بعضها ممرضة للإنسان وأخرى للحيوان.

تضم هذه الشعبة فطريات مأكولة مثل الكمأة، وفطريات منتجة لمركبات هامة مثل الكحولات والأحماض العضوية والمضادات الحيوية.

كما يقع تحت هذه الشعبة الخمائر التي تعتبر الأساس في صناعة الخبز والعديد من الصناعات الأخرى.

أهم الأجناس الفطرية التابعة لهذه الشعبة :

جنس *Aspergillus*

المواد والأدوات اللازمة:

أطباق بتري تحوي مزارع فطرية معزولة من الهواء أو التربة؛ إبرة مستقيمة وحربة، صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن؛ مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

طريقة العمل:

افحص أحد الأطباق الحاوية على مستعمرات فطرية معزولة من التربة أو الهواء ولاحظ أن مستعمرات *Aspergillus* شبيهة بمستعمرات الجنس *Rhizopus* إلا أنها محدودة الانتشار نسبياً، وحواملها البوغية اقصر من سابقتها، ويكون لونها مائلاً للأزرق المخضر وعند قلب الطبق نجد أن لون المستعمرة مائل للاصفرار.

(الشكل–٣٧) ***Aspergillus sp***

جهز محضراً فطرياً بنفس الطريقة السابقة: وافحصه عند التكبيرات الضعيفة x١٠ ولاحظ أن: (الشكل–٣٧)

- الميسليوم مقسم.
- الحوامل البوغية طويلة نسبياً غير مقسمة و غير متفرعة، تحمل في نهايتها انتفاخاً يتولد عنه سلاسل من الأبواغ الكونيدية ذات لون بني داكن، تعطي الفطر مظهر الرأس ذي الشعر الأجعد (لاحظ أن منشأ الأبواغ خارجي)
- ارسم ما تشاهده في دفترك

جنس *Penicillium*

طريقة العمل:

افحص أحد الأطباق الحاوية على مستعمرات فطرية معزولة من التربة أو الهواء أو قشور الثمار المتعفنة، ولاحظ مستعمرات الجنس *Penicillium* التي تبدو على شكل مسحة زرقاء أو خضراء أو رمادية اللون محاطة غالباً بهالة بيضاء، ويعود لون المستعمرة إلى لون الأبواغ الكونيدية التي ينتجها الفطر بأعداد هائلة.

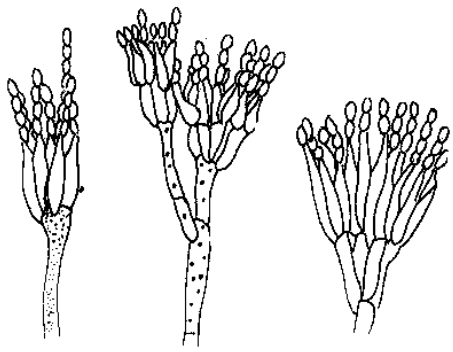
جهز محضراً مجهرياً من مستعمرة *Penicillium* لا يتجاوز عمرها اليومين وذلك على النحو التالي:

١- استخدم إبرتي تلقيح واقتطع جزءاً من الوسط المغذي الذي ينمو عليه الفطر من المنطقة بين اللون الأخضر والأبيض من المستعمرة.

٢- ضع الكتلة المأخوذة على شريحة زجاجية نظيفة وسط قطرة من صبغة أزرق القطن مع اللاكتوفينول ثم غطها بساترة زجاجية نظيفة، واضغط عليها بلطف بواسطة طرف إبرة التلقيح لإزالة الفقاعات الهوائية ومباعدة بنيات الفطر عن الوسط المغذي

٣- افحص أولاً حواف المحضر عند التكبيرات الضعيفة ثم انتقل إلى التكبير x٤٠ ولاحظ: (الشكل-٣٨)

- المظهر العام للفطر الذي يأخذ شكل الفرشاة أو المكنسة.
- الميسليوم المقسم.
- الحامل الكونيدي القصير نسبياً والمتفرع.



(الشكل-٣٨) *Penicillium sp*

- نهاية تفرعات الحوامل تحمل انتفاخات قارورية الشكل هي الفياليدات ينشأ عن كل منها سلسلة من الأبواغ الكونيدية الصغيرة.

ارسم ما تشاهده عند التكبير x٤٠.

جنس *Taphrina*

وهو من الأجناس الممرضة للنبات حيث يسبب النوع *T.deformans* مرض تجعد أوراق الدراق.

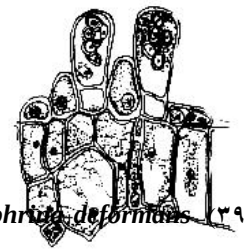
الأدوات والمواد اللازمة:

أوراق دراق مصابة بمرض تجعد أوراق الدرّاق؛ شفرة حادة؛ ملقط؛ صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن؛ المجهر ومستلزمات العمل المجهري.

طريقة العمل:

- اعمل عدة مقاطع عرضية في ورقة درّاق مصابة باستخدام شفرة حادة، وانقلها إلى شريحة زجاجية نظيفة تحوي قطرة من صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن ثم غطّها بساترة زجاجية نظيفة وافحصها عند التكبير x٤٠، ولاحظ:(الشكل-٣٩)
- توضّع الأكياس الأسكية بشكل حر على سطح النسيج النباتي المصاب بالفطر
- الأكياس الأسكية شفافة يُلاحظ بداخلها أبواغ أسكية كروية غالباً يمكن عدّها.

ارسم ما تشاهده في دفترك



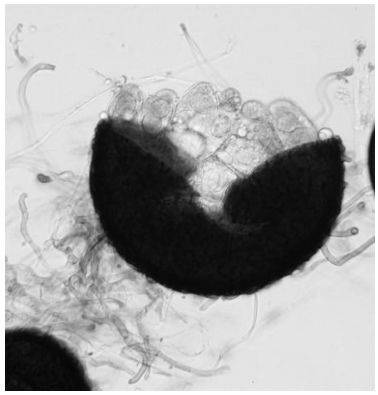
(الشكل-٣٩) *Taphrina deformans*

جنس *Erysiphe*

وهو أحد الأجناس المسببة لأمراض البياض الدقيقي Powdery Mildews التي تصيب القرعيات والبقوليات والصليبيات والشوندر ونباتات أخرى، وتتميز هذه الأنواع بأنها إجبارية التطفل، تشكّل أجساماً ثمرية (ثمار أسكية) تحوي بداخلها الأكياس الأسكية.

طريقة العمل:

استعن بمحضر مجهري جاهز وافحصه عند التكبير x٤٠ ولاحظ: (الشكل-٤٠)



- الجسم الثمري كروي الشكل – يتفتح عشوائياً من أماكن مختلفة غير محددة تخرج منه الأكياس الأسكية.
- الأكياس الأسكية شفافة وبداخلها أبواغ أسكية كروية.

(الشكل-٤٠) ***Erysiphe sp***

الفطريات الأسكية اللاجنسية Asexual Ascomycota

تتبع هذه المجموعة من الفطريات إلى صف الفطريات الناقصة *Deutromycetes* وهي مجموعة غير متجانسة من الفطريات، الميسلسيوم فيها مقسم، تشترك في صفة أن الطور الجنسي الكامل غير معروف. تتكاثر لا جنسياً بواسطة الأبواغ الكونيدية، والتي تأخذ أشكالاً مختلفة كما أن بعضها لا يكوّن أبواغاً كونيدية، ويطلق عليها فطريات المشائج العقيمة Mycelia sterilia

من أشهر الأجناس التابعة للفطريات الناقصة :

جنس *Alternaria*

توجد أبواغ جنس *Alternaria* في التربة، ويمكن أن تتطفل على الأجزاء الهوائية للنبات مسببةً أمراضاً على محاصيل عديدة تعرف بأمراض التبقع الألترناري، كما يسبب النوع *A.solani* مرض اللفحة المبكرة على الباذنجانيات، الذي يؤدي لخسائر كبيرة خاصة على البطاطا، كما يصيب البندورة المزروعة في البيوت المحمية أو الحقول.

طريقة العمل:

افحص الأطباق الحاوية على مستعمرات فطرية معزولة من التربة ولاحظ الصفات المزرعية لجنس *Alternaria* والتي تتميز مستعمراتها بنمو مخملي يأخذ اللون الزيتوني الداكن، وعند قلب الطبق نجد أن المستعمرات تأخذ اللون الأسود.

جهِّز محضراً مجهرياً من أحد مستعمرات جنس *Alternaria* وافحصه عند التكبير x٤٠ ولاحظ أن: (الشكل-٤١)

(الشكل-٤١) ***Alternaria***

- الهيفا مقسمة.
- الحوامل البوغية غير مميّزة عن الميسليوم.
- الأبواغ الكونيدية كبيرة، مقسمة بحواجز حقيقية عرضية وطولية، تقسم البوغة إلى عدة خلايا. وتأخذ الأبواغ أشكالاً مختلفة (كروية، إجاصية، صولجانية....)
- تجتمع الأبواغ على شكل سلاسل قد يصل عددها إلى ١٢بوغة في السلسلة الواحدة.
- تبدو الأبواغ والهيفا بلون داكن.

ارسم ما تشاهده في دفترك.

جنس *Fusarium*

وهو من الأجناس الهامة. يتبعه أنواع عديدة تعيش بعضها في التربة حياةً رميةً على البقايا النباتية وتشكل أبواغاً كلاميدية تستطيع مقاومة الظروف الصعبة، والاحتفاظ

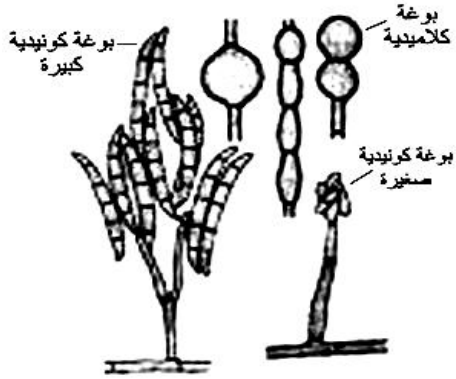
بحيويتها عدة سنوات. وهناك أنواع متطفلة تصيب الأوعية الناقلة للنبات، وتؤدي إلى إصابتها بأمراض الذبول الوعائي.

طريقة العمل:

افحص الأطباق الحاوية على مستعمرات فطرية معزولة من التربة ولاحظ الصفات المزرعية لأنواع جنس *Fusarium* التي تبدو على شكل طبقة رخوة تشبه القطن المندوف، بألوان مختلفة بيضاء أو صفراء وغالباً وردية، كما يتلون الوسط المغذي الذي تنمو عليه بألوان متباينة من الوردي وحتى البني.

جهّز محضراً مجهرياً من أحد مستعمرات جنس *Fusarium* ولاحظ : (الشكل-٤٢)

- الهيفا مقسمة.
- يُشكل الفطر ثلاثة أشكال من الأبواغ يمكن رؤيتها جميعاً في محضر مجهري واحد في بعض الأحيان وهي:



(الشكل-٤٢) ***Fusarium sp***

- أبواغ كونيدية صغيرة Microconidia مكونة من خلية أو اثنتين، غالباً ما يكون طولها ضعفي عرضها.
- أبواغ كونيدية كبيرة Macroconidia وهي الأبواغ المميزة لجنس *Fusarium* ذات شكل منجلي مقوس غالباً، كبيرة الحجم نسبياً، ومقسمة إلى عدة خلايا (٣-٥) خلايا
- أبواغ كلاميدية Chlamydospores وهي تمثل الطور الحافظ للفطر، حيث تبقى هذه الأبواغ في التربة لفترة طويلة محتفظة بحيويتها، تأخذ الشكل الكروي وتمتلك جداراً سميكاً – وقد نجدها في وسط الهيفات (بينيّة) أو على أطراف الهيفا (طرفية).

ارسم ما تشاهده على دفترك، و سمِّ الأبواغ التي تراها في المحضر المجهري.

شعبة الفطريات الدعامية (البازيدية) phylum : *Basidiomycota*

تعتبر الفطريات البازيدية من أرقى المجموعات الفطرية وأكثرها تعقيداً، غالبية أنواعها كبيرة الحجم تعيش متطفلة أو مترممة على بقايا جذوع الأشجار أو على المادة العضوية في التربة. كما تضم الفطريات البازيدية فطريات مجهرية الأبعاد تعرف بفطريات الصدأ Rust Fungi وفطريات التفحمات Smut Fungi التي تتطفل على كثير من النباتات الزهرية الاقتصادية أهمها محاصيل الحبوب.

الميسليوم غزير، والهيفا مقسمة بحواجز عرضية مثقبة. تتكاثر الفطريات البازيدية جنسياً بواسطة الأبواغ البازيدية Basidiospores التي تنشأ من بنية صولجانية الشكل تدعى الدعامة Basidium (جمعها Basidia)

فطريات الصدأ The Rust Fungi

هي فطريات إجبارية التطفل، وتعدّ من أهم مسببات أمراض النبات حيث تتطفل على محاصيل الحبوب والمحاصيل الحقلية ونباتات الزينة وحتى على الأشجار المثمرة والحراجية. تعود تسمية هذه الفطور بالأصداء نظراً لتشكيلها بثرات بلون يشبه صدأ الحديد على سطح النباتات المصابة.

يتبع فطريات الصدأ أجناس عديدة أهمها الجنس *Puccinia* الذي يتميز بتشكيل أبواغ تيلية معنّقة (لها حامل) مؤلفة من خليتين دائمتي الالتحام يحيط بهما جدار واحد.

الأدوات والمواد اللازمة:

- أوراق نباتية مصابة بالفطر مثل أوراق الخبيزة و القمح و الثوم تحوي بثرات داكنة اللون .
- شرائح وساترات زجاجية.
- إبرة تلقيح مستقيمة أو حربة.
- صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن.

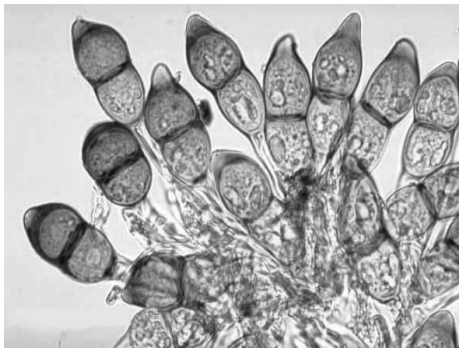
طريقة العمل

- ضع قطرة من الصبغة وسط شريحة زجاجية نظيفة.

– بواسطة الإبرة أوالحربة ، مزّق إحدى البثرات الداكنة وخذ جزءاً بسيطاً من الأبواغ داكنة اللون وانقلها إلى قطرة الصبغة.

– غط المحضر بساترة زجاجية نظيفة مع الضغط الخفيف عليها لطرد الفقاعات الهوائية ومباعدة أبواغ الفطر.

– افحص المحضر عند التكبير x٤٠ ولاحظ: (الشكل–٤٣)



(الشكل–٤٣) ***Puccinia sp***

– البوغة التيلية مكونة من خليتين دائمتي الالتحام

– البوغة التيلية محمولة على حامل شفاف (معنّقة)

– ارسم الشكل المميز للأبواغ التيلية للجنس *Puccinia*.

فطريات التفحمات: The Smut Fungi

غالبية فطريات التفحمات إجبارية التطفل. تصيب محاصيل عديدة أهمها الحبوب، وتحدث فيها خسائر فادحة. وتعود تسمية هذه الفطريات بالتفحمات نظراً لتشكيل الفطر المسبب لمسحوق فحمي أسود ناتج عن الأبواغ التيلية.

من أهم الأنواع التي تصيب القمح النوع *Tilletia caries* الذي يسبب مرض التفحم المغطى (النتن) على القمح.

المواد والأدوات اللازمة:

– حبوب قمح مصابة بالفطر *T.caries*.
– إبرة تلقيح مستقيمة أو حربة.
– شرائح وساترات زجاجية.
– صبغة اللاكتوفينول مع أزرق القطن.

طريقة العمل:

– ضع قطرة من الصبغة وسط شريحة زجاجية نظيفة.

– اضغط بطرف الإبرة أو الحربة على أحد الحبوب المصابة (لاحظ أنها هشة سهلة الكسر).

– خذ جزءاً من الهباب الأسود بطرف الإبرة وانقله إلى قطرة الصبغة

– غط الشريحة بساترة زجاجية نظيفة مع الضغط الخفيف عليها بواسطة طرف الإبرة لمباعدة الأبواغ وطرد الفقاعات الهوائية

Tilletia sp (الشكل–٤٤)

– افحص المحضر عند التكبير ٤٠× ولاحظ: (الشكل–٤٤)

– الأبواغ التيلية وحيدة الخلية كروية الشكل.

– وجود تزيينات شبكية مضلعة على سطح البوغة.

– الشكل واللون العام للأبواغ يشبه ليرات الذهب إلى حد بعيد.

ارسم الأبواغ التيلية في دفترك مُظهراً التزيينات التي على سطح البوغة.

الـخمائــر

الخمائر مجموعة من الكائنات المجهرية، وحيدة الخلية، لا تشكل ميسيليوماً حقيقياً تتبع شعباً مختلفة من الفطريات : *Ascomycetes* ، *Basidiomycetes* ، *Deuteromycetes*. إلا أن أغلبها ينتمي إلى شعبة الفطريات الأسكية *Ascomycetes*. يتراوح قطر خلايا الخمائر بين (٨-١٥) ميكرون، وهي ذوات أشكال مختلفة جداً : إما اهليليجية أو إجاصية أو كروية أو بيضاوية أو ليمونية أو أسطوانية.

تتكاثر الخمائر خضرياً وجنسياً؛ خضرياً بالتبرعم كالأنواع التابعة للجنس *Saccharomyces* وبالانشطار كالأنواع التابعة للجنسين *Endomyces* و*Schizosaccharomyces*. ويرتبط التكاثر الجنسي بتشكل الأبواغ، حيث تتكون عند ذلك الأكياس الأسكية ويتشكل بداخل كل كيس بين (٢-٨) بوغة و أحياناً (١٢) بوغة. علماً أن بعض الخمائر غير قادرة على التكاثر جنسياً وتتبع إلى صف الفطريات الناقصة، مثل خمائر *Torula lactis* التي تتكاثر فقط بالتبرعم.

هناك خمائر تتصف بقدرتها على الإنشطار والتبرعم معاً مثل الأنواع التابعة للجنسين *Candida* و *Endomycopsis*. بعض الخمائر يمكن أن تحتل مكاناً وسطاً بين الانشطار و التبرعم. وتسمى بالخمائر المتبرعمة المنشطرة مثل: *Saccharomycodes* و *Nadsonia*.

الخواص المزرعية للخمائر :

تتميز مستعمرات الخمائر النامية على الأوساط المغذية الصلبة بشكل واضح عن المستعمرات الفطرية، حيث تبدو مستعمرات الخمائر دائرية أو مجدافية أو محدبة أو ملساء وأحياناً ذوات تعرجات ملونة بألوان مختلفة إما بيضاء أو حليبية أو صفراء أو برتقالية أو وردية فاقعة وأحياناً عديمة اللون.

الفحص المجهري للخمائر :

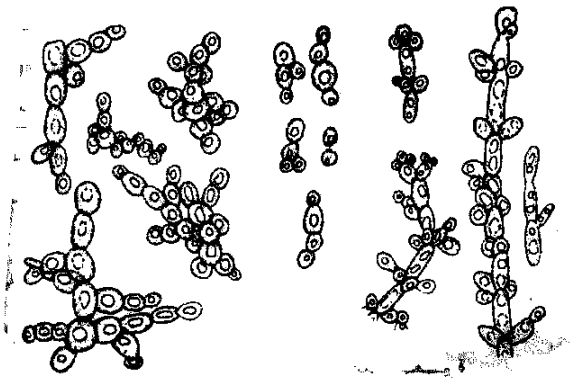
١- قبل الجلسة العملية بسويعات، يتم وضع قطعة صغيرة من خميرة *Saccharomyces cerevisiae* في مياه معقمة دافئة، محلاّة بالسكروز وتوضع في مكان دافئ. فيتشكل سائل حليبي اللون، يؤخذ منه قطرة صغيرة بواسطة ماصة عقيمة ويوضع على شريحة زجاجية نظيفة وتغطى القطرة بساترة زجاجية مع مراعاة عدم تشكل فقاعات. ثم توضع قطرة من زيت الأرز على الساترة وتفحص بالعدسة الغاطسة يمكن ملاحظة عرقان (ضربان) من الخميرة: (الشكل-٤٥)

الأول : عبارة عن خلايا كروية الشكل تنقسم بسرعة بالتبرعم .

الثاني : خلايا متطاولة أسطوانية تشكل في أثناء التبرعم ما يشبه الشجيرات (الميسليوم الكاذب).

٢- يتم تجهيز محضر الخلايا المثبتة من خميرة اللبن *Tourla lactis* ويُصبغ بالفوكسين، ويشاهد بالعدسة الغاطسة. يمكن ملاحظة الخلايا المتبرعمة كما يمكن ملاحظة أن خلايا *Saccharomyces cerevisae* أكبر بشكل واضح من خلايا *Tourla lactis* .

٣- يُثبت ويلوّن بالفوكسين محضر من *Schizosaccharomyces pombe*. ويُشاهد بالعدسة الغاطسة. يمكن ملاحظة أن الخلايا الخمائرية أسطوانية كبيرة ذوات حواف دائرية كما يمكن مشاهدة الخلايا وهي في مرحلة الانشطار .



(الشكل-٤٥) خمائر ***Sacchoromyces cerevisiae***

الفصل الثامن
طرائق تحديد تعداد الكائنات الحية الدقيقة

أولاً – طريقة العدّ المباشر تحت عدسة المجهر Direct Count :

من مساوئ هذه الطريقة أن الخلايا الحية والميتة تحسب على حدٍ سواء. كما أن الأحياء الدقيقة المقدّرة بهذه الطريقة، هي فقط تلك التي تقع ضمن حدود تكبير المجهر الضوئي. كما لا تسمح هذه الطريقة بإعطاء تصّور عن العمليات التي تقوم بها هذه الكائنات ضمن وسطها الطبيعي والعلاقات المتبادلة بين الكائنات. لكن هذه الطريقة تمتاز بإمكانية حفظ المحضرات لوقت طويل، وبالتالي إجراء عملية العدّ في أي وقت يراه الدارس مناسباً له. كما لا تحتاج إلى معدات وأدوات كثيرة. وتُجرى عادة بشكل أسرع من الطرق الأخرى.

المواد والأدوات اللازمة:

المادة المراد معرفة تعداد الكائنات الدقيقة فيها؛ ممصات شعرية؛ شرائح زجاجية؛ ورق ميلمتري، آجار ٠.٠٣% معقم، كحول إيتيلي ٩٦%، إبر لاقحة، صبغات مختلفة؛ مجهر؛ شبكة عينيّة مربعة؛ مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة :

١- تؤخذ كمية من معلّق (مخفف) الوسط المدروس محسوبة بدقة متناهية تستخدم من أجل ذلك ممصات شعرية (يوضع عادة ٠.٠٥ مل) .

٢- تنقل العينة إلى شريحة زجاجية جافة وخالية من الدهن، توضع الشريحة الزجاجية على ورقة ميليمترية محدد عليها مساحة معلومة (٦ سم^{٢} مثلاً).

٣- يُضاف إلى العينة نقطة من الأجار المائي ٠.٠٣% المعقم والمحضّر حديثاً. وبواسطة إبرة لاقحة معقمة ومبرّدة يُوزّع الآجار المائي مع العينة، على عَجَل، وبشكل متجانس وذلك على المساحة المحددّة بالورق الميليمتري.

٤- تُجفف اللطاخة (الغشاء) في الهواء وتُثَبّت لمدة (٢٠-٣٠) دقيقة بواسطة الكحول

الإيتيلي ٩٦% .

٥- يُصبغ المحضر بإحدى الصبغات المناسبة. ويُغسل بعدها بالماء ويُجفف بالهواء ويُفحص بالغاطسة .

٦- يوضع في العدسة العينية للمجهر شبكة عينية مربعة .

٧- تُعدّ الخلايا الموجودة في (٥٠-١٠٠) شبكة مربعة (ليس أقل من ١٠ حقول رؤية).

ملاحظة :

في حال عدم توفر الشبكة العينية يمكن حساب عدد الخلايا الموجودة في كامل مساحة حقل الرؤية و بحيث لا تقل عدد الخلايا المعدودة في حقول الرؤية المفحوصة عن ٦٠٠ - ١٠٠٠ خلية .

٨- يجري حساب متوسط الخلايا الموجودة في المربع الواحد من الشبكة العينية (أو حقل الرؤية) . وتساوي $\overline{X} = \frac{\Sigma X}{n}$ حيث :

n = عدد المربعات المحسوبة من الشبكة العينية (أو عدد حقول الرؤية).

ΣX = مجموع الخلايا المعدودة .

ولحساب عدد الخلايا في ١ مل من الوسط المدروس من الضروري معرفة الآتي:

١- مستوى التخفيف ($\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$, $\frac{1}{10000}$ .....). ويتم إجراء التخفيفات المتتالية في حال كانت العينة الابتدائية المدروسة تحوي عدداً كبيراً من الكائنات الحية الدقيقة (كما في التربة مثلاً). ثم يُحدد التخفيف الذي أُخذت منه الكمية المدروسة (انظر طريقة تجهيز التخفيفات المتتالية في فقرة عدّ الأحياء الدقيقة بطريقة الأطباق في هذا الفصل).

٢- حجم المعلق المدروس (أي حجم العينة المأخوذة ليُجهز منها محضّر وهو هنا يساوي ٠.٠٠٥ مل)

٣- مساحة اللطاخة : وهي هنا تساوي $٦.١٠^{-٨}$ ميكرومتر. (٦ سم^{٢})

٤- مساحة مربع الشبكة العينية (أو مساحة حقل الرؤية). يمكن معرفة مساحة مربع الشبكة العينية أو مساحة حقل الرؤية بمساعدة شريحة القياس الميكروميترية (انظر طريقة

تقدير أبعاد الكائنات الحية الدقيقة بواسطة المجهر). توضع هذه الشريحة على ساحة المجهر في نفس مكان وضع المحضر وتشاهد عند نفس التكبير الذي جرى عنده عدّ الخلايا. ويُقاس بواسطتها طول ضلع مربع الشبكة العينية (أو قطر حقل الرؤية). ثم يحسب مساحة المربع (S) أو مساحة حقل الرؤية التي تساوي مساحة الدائرة $S = \pi r^2$.

ويحسب عدد الخلايا الموجودة في ١غ (١ مل) من الوسط المدروس حسب المعادلة التالية :

$$\frac{\overline{X} \cdot 6 \cdot 10^8 \cdot K}{S \cdot 0.05}$$

حيث : $\overline{X}$ – متوسط عدد الخلايا في المربع الواحد من الشبكة العينية (أو في حقل الرؤية).

6.10^8 – مساحة اللطاخة مقدرة بالميكروميتر .

K – مستوى التخفيف . المأخوذ من العينة (في حال وجوده).

S – مساحة مربع الشبكة بالميكروميتر (أو مساحة حقل الرؤية).

0.05 – حجم العينة المأخوذة من المادة المدروسة مباشرة أو من التخفيف المناسب (مل).

ثانياً– طريقة العدّ المباشر تحت عدسة المجهر باستخدام أقراص الترشيح :

تُستخدم هذه الطريقة لمعرفة تعداد الكائنات الحية الدقيقة في الماء أو في أوساط سائلة أخرى. ويتم اللجوء إلى هذه الطريقة عندما يكون عدد الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في الوسط السائل المدروس قليلاً. ويُستخدم لذلك أجهزة ترشيح (مرشحات) كتلك المستخدمة عند تعقيم المياه والسوائل.

قبل إجراء الطريقة لابد من تعقيم غشاء الترشيح بالصاد الموصد وحامل غشاء الترشيح بالكحول ثم باللهب. ويجب أن يسمح الفلتر (غشاء الترشيح) المستخدم بمرور المياه من خلاله دون البكتريا.

المواد والأدوات اللازمة:

وحدة ترشيح زايتر مثلاً؛ المادة المراد تقدير عدد الكائنات الحية الدقيقة فيها؛ فورمالين ٤٠%،

إيروتروسين، مجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة:

١- يجري تمرير (ترشيح) كمية معلومة من السائل من خلال غشاء الترشيح مع التفريغ الذي تحدثه مضخة موصلة بحوجلة الاستقبال (انظر طريقة تعقيم السوائل بالترشيح).

٢- بعد الانتهاء من ترشيح كمية السائل المعلومة، يرفع الغشاء من الجهاز بواسطة ملقط معقم.

٣- تُثبت البكتريا العالقة على الغشاء بالفورمالين ٤٠% لمدة (١٠) دقائق.

٤- يصبغ الغشاء بالإيروتروسين مدة (٣٠-٦٠) دقيقة وأحياناً لمدة يوم كامل.

٥- تُغسل الصبغة الزائدة بالماء ويجفف الغشاء عند (٣٠–٤٠) مْ.

٦- يعامل الغشاء بزيت الأرز فيصبح عندها شفافاً.

٧- يشاهد الغشاء بالعدسة الغاطسة. وتحسب عدد البكتريا الموجودة في حوالي (١٠٠) حقل رؤية وذلك للحصول على نتائج دقيقة. ثم يحسب متوسط عدد البكتريا الموجودة في حقل رؤية واحد.

٨- لحساب عدد الخلايا في (١) مل من السائل المرشَّح نتبع ما يلي:

أ- يُحَدّد قطر الفلتر (غشاء الترشيح) بالورق الميليمتري، ثم تُحسب مساحة الغشاء (مساحة الدائرة).

ب- يحدد قطر حقل الرؤية بواسطة شريحة القياس الميكروميترية الشيئيّة بعد وضعها في ساحة المجهر، عند نفس التكبير الذي فحصت فيه البكتريا. ثم تُحْسَب مساحة حقل الرؤية (مساحة الدائرة أيضاً).

حـ – تحسب عدد حقول الرؤية الموجودة في غشاء الترشيح وهي تساوي :

$$\frac{\text{مساحة الغشاء}}{\text{مساحة حقل الرؤية}}$$

ء – تحسب عدد الخلايا الموجودة على الغشاء والتي تساوي حاصل جداء عدد حقول الرؤية الموجودة في غشاء الترشيح بمتوسط عدد الخلايا في حقل رؤية واحد.

هـ– بمعرفة حجم السائل المرَشَّح يمكن حساب عدد الخلايا في (١) مل من السائل:

عدد الخلايا (البكتريا) في (١) مل من السائل =

$$\frac{\text{عدد الخلايا (البكتريا) الموجودة على الفلتر}}{\text{حجم السائل المرَشَح}}$$

ثالثاً– عدّ الأحياء الدقيقة بطريقة الأطباق

: Standard plate count

تُستخدم هذه الطريقة على نطاق واسع، لتحديد كمية الكائنات الحيّة الدقيقة في الماء والمواد الغذائية والتربة وغيرها.... وبهذه الطريقة يمكن معرفة الأنواع الأكثر انتشاراً (وجوداً) في المادة المدروسة. كما يمكن عزل الكائنات الدقيقة، وبالتالي إمكانية دراسة خصائصها الفيزيولوجية والمورفولوجية .

وتتلخص هذه الطريقة في زرع حجم معين من معلق المادة المدروسة، في طبق بتري (أو أطباق)، تحوي بيئة غذائية مناسبة، والقيام من ثم بعملية التحضين عند درجة حرارة تتناسب والخواص الفيزيولوجية للكائنات الدقيقة المراد إظهارها ومن ثم إجراء الدراسة الكمية والنوعية للمستعمرات النامية. عند ذلك نعتبر أن كل مستعمرة ظهرت هي نتيجة لتكاثر خلية واحدة.

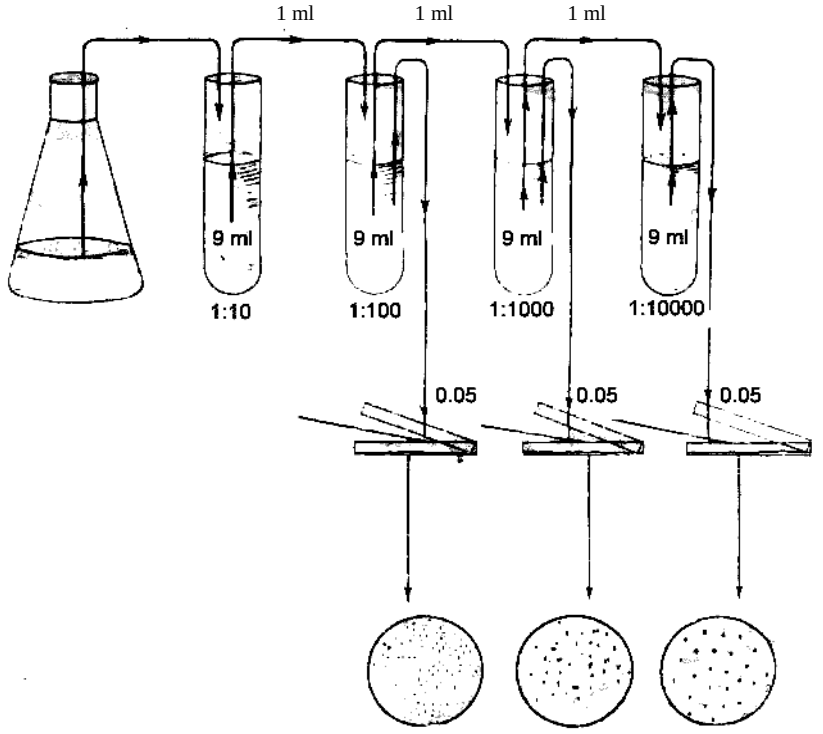
إن العمل بهذه الطريقة يقتضي إجراء الخطوات التالية :

١– تجهيز الأدوات والتي هي :

أطباق بتري معقمة، أنابيب اختبار تحوي كل واحدة (٩) مل ماء معقم أو حوجلات تحوي كل حوجلة على (٩٠) مل ماء معقماً، وإبر لاقحة أو ماسحات زجاجية (الناشر) ماصات عادية معقمة سعة (١) مل، و ماصات مدرجة معقمة سعة (١) مل، حمام مائي .

٢– اختيار الوسط المغذي الملائم للهدف من الدراسة: ذلك باعتبار أنه لا يوجد وسط مغذٍ واحد يكفل نمو جميع الأنواع المختلفة من الكائنات الدقيقة .

٣- تجهيز التخفيفات المتتالية Dilution method: قد توجد الكائنات الحية الدقيقة في وسط ما بكميات كبيرة الأمر الذي يصعب معه دراستها مباشرة لذا يُلجأ إلى إجراء ما يسمى بالتخفيفات المتتالية (الشكل-٤٦) وذلك على النحو التالي :



(الشكل-٤٦) طريقة تجهيز التخفيفات المتتالية

آ- يؤخذ بواسطة ممص معقم (١) مل من العينة المراد دراستها (إن كانت سائلة، ماء مثلاً) أو (١)غ (إن كانت صلبة، تربة مثلاً وفي هذه الحالة لا داعي طبعاً لاستخدام الماصة) ويوضع في أنبوب اختبار يحوي (٩) مل من الماء المعقم. فنكون بذلك قد حصلنا على التخفيف $\frac{1}{10}$. يُسْتبعد الممص ويُرج الأنبوب جيداً.

ب- بواسطة ممص معقم آخر يؤخذ (١) مل من أنبوب الاختبار الأول ويوضع في أنبوب اختبار آخر (ثانٍ) يحوي على (٩) مل ماء معقم . فنحصل بذلك على التخفيف $\frac{1}{100}$. تُمزج محتويات الأنبوب الثاني جيداً عن طريق الرَجّ.

جـ- بواسطة ممص معقم جديد يؤخذ (١) مل من أنبوب الاختبار الثاني لينقل إلى

أنبوب اختبار آخر (ثالث) يحتوي على (٩) مل ماء معقم . فنكون بذلك قد حصلنا على التخفيف $\frac{1}{1000}$. وهكذا بنفس الطريقة يمكن الحصول على التخفيف $\frac{1}{10,000}$ و $\frac{1}{100,000}$.... ، ويتوقف عدد التخفيفات الواجب إجراؤها على عدد الكائنات المتوقع وجودها في الوسط الابتدائي، فكلما كان احتمال وجود هذه الكائنات بكميات كبيرة، زادت عدد التخفيفات الواجب إجراؤها. ويجب أن لا يغيب عن البال :

– أن هذه الخطوة هامة جداً ويتوقف على حسن ودقة إجرائها النتائج اللاحقة.

– ضرورة استبدال الماصة بأخرى معقمة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر.

– إجراء هذه العملية ضمن ظروف معقمة، إما قرب المصباح الغازي أو الكحولي أو في غرفة العزل.

– كتابة أرقام التخفيفات على أنابيب الاختبار إما بشكل مسبق أو مباشرة عند إجرائها.

ملاحظة :

تستخدم أيضاً لإجراء التخفيفات في كثير من الأحيان حوجلات زجاجية تحتوي كل منها على (٩٠) مل ماء معقم. عند ذلك يؤخذ من العينة الابتدائية (١٠) مل أو (١٠)غ لتوضع في الحوجلة الأولى . وعند الانتقال من تخفيف إلى آخر يستخدم لذلك ماصات سعة (١٠) مل .

٤– إسالة الوسط المغذي :

ويتم في حمام مائي عند (١٠٠)ْ م ويُنْتَظر حتى تنخفض حرارة الوسط إلى (٤٥)م. ثم يُوزَّع في ظروف معقمة، ضمن أطباق بتري معقمة، حيث توضع الأطباق على سطحٍ مستوٍ، وبحركة رحوية بسيطة يُوزّع الوسط المغذي على كامل مساحة الطبق.

ملاحظة :

يُفَضَّل تحضين الأطباق بعد توزيع الوسط (قبل زرعها) مقلوبةً، عند (٣٠) مْ. وذلك ليجف سطح الوسط من جهة ولاختبار كفاءة تعقيمه من جهة أخرى، حيث

تُسْتَبعد الأطباق التي نمت عليها ميكروبات بعد التحضين . إلا أنه يمكن عدم القيام بهذه الخطوة في حال كانت البيئة المستخدمة انتخابية أو عند الرغبة في زرع كائنات دقيقة محبة للرطوبة (علل ذلك).

٥- اختيار التخفيفات التي سيتم منها الزرع: ويتوقف ذلك على عدد الكائنات الدقيقة المتوقع وجودها في المادة الابتدائية المدروسة. فكلما كان تعداد الكائنات الدقيقة أكبر، كان عدد التخفيفات الواجب إجراؤها أكثر .

٦- إجراء عملية الزرع: يؤخذ بواسطة ممص معقم ومدرج كمية محدودة (عادة ٠.٠٥ مل) من التخفيف المختار ويوضع على سطح البيئة الغذائية الموزّعة في طبق بتري، ويتم نشر هذه الكمية على كامل سطح الطبق بواسطة ماسحة (ناشر) زجاجية معقمة أو إبرة تلقيح معقمة، واستخدام الأولى أفضل وذلك لسهولة انزلاقها على سطح البيئة ويسمى الزرع عند اتباع ذلك بالزرع السطحي. يُخَصّص لكل تخفيف (٣-٥) أطباق كمكررات. ويمكن استخدام ممص مدرج واحد عند الأخذ من نفس التخفيف، إلا أنه يجب حتماً استخدام ممص آخر معقم عند الأخذ من تخفيف آخر.

ملاحظة:

يَتم إجراء عملية الزرع في بعض الأحيان، بنقل (١) مل من التخفيف المناسب (أو المادة) إلى طبق معقم، ثم تصب البيئة الغذائية المسالة و المبردّة حتى (٤٥) ْم. ويتم مزج محتويات الطبق بشكل جيد بتحريكه حركة رحوية بسيطة ومتأنية على سطحٍ مستوٍ. ويسمى الزرع عندها بالزرع العميق .

٧- يُكْتَب على السطح الخارجي لغطاء الطبق المعلومات الضرورية مثل: مستوى التخفيف – تاريخ الزرع – المادة المزروعة – الوسط المغذي المستخدم وغيرها من المعلومات. علماً بأن عملية الزرع يجب أن تُجرى ضمن ظروف معقمة، في غرفة خاصة تسمى غرفة الزرع أو العزل .

٨- تحضين الأطباق المزروعة :

يتم تحضين الأطباق في الحاضنة عند درجة حرارة مناسبة للخواص الفيزيولوجية

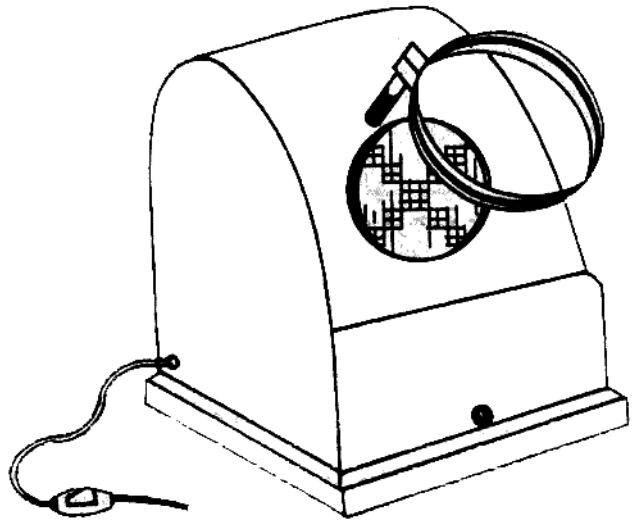
للكائنات الدقيقة المراد إظهارها ودراستها.وتوضع الأطباق في الحاضنة مقلوبةً، وذلك لمنع سقوط الماء المتكاثف من غطاء الطبق على السطح العلوي للبيئة.

٩- حساب عدد الكائنات الحية الدقيقة :

بعد عدة أيام من التحضين، تبدأ خلايا الكائنات الدقيقة بالتكاثر و النمو. وتشكل عند ذلك مستعمرات تُرَى في أغلب الأحيان بالعين المجردة. وتتوقف المدة اللازمة للتحضين على سرعة نمو الأحياء الدقيقة المدروسة وعلى الوسط المغذي المستخدم وعلى درجة الحرارة وغيرها من العوامل . يُجرى عدّ المستعمرات التابعة لكل تخفيف على حدة. ثم يُحْسَب المتوسط الحسابي لعدد المستعمرات التابعة لكل تخفيف. ويُضرب بمقلوب التخفيف. وفي حال أُخذ (٠.٠٥) مل من التخفيف ليزرع في الأطباق، يتم ضرب الناتج بالرقم (٢٠)، وذلك للحصول على عدد الخلايا في (١) مل. أما عند زرع (١) مل من التخفيف فلا داعي لعملية التحويل إلى (١) مل.

ومن أجل التحديد الصحيح لتعداد الخلايا، يؤخذ بعين الاعتبار الأطباق التي تحوي عدداً من المستعمرات بين (٣٠- ٣٠٠) مستعمرة .

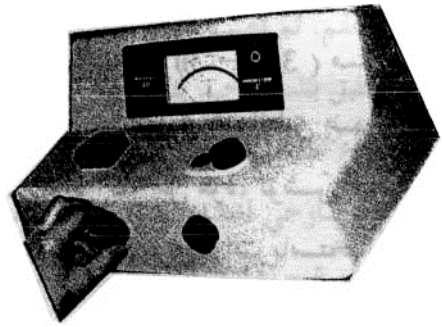
عند القيام بعدّ المستعمرات يُشاهد الطبق ضمن حزمة ضوئية، وكي لا يتكرر عدّ المستعمرة الواحدة أكثر من مرة، تؤشرّ المستعمرة المعدودة بواسطة قلم حبر أسود. هذا ويمكن عدّ المستعمرات باستخدام جهاز عدّ المستعمرات (الشكل-٤٧).



(الشكل–٤٧) رسم تخطيطي جهاز عدّ المستعمرات

رابعاً– تقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة عن طريق تحديد درجة العكارة (التعكير) Turbidimetry Determination

تحتاج طريقة العدّ بالأطباق إلى عدد كبير من الأدوات والزجاجيات، كما يلزم تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها وإجراء عملية الزرع، وكل ذلك يتم في وقت طويل. في هذه الحالة، تعتبر الطريقة الأسرع، هي قياس درجة العكارة (التعكير) لمزرعة بكتيرية بواسطة جهاز الفوتوكلورميتر Photocolorimeter . (الشكل–٤٨) ومن ثم تحويل هذه القراءة إلى عدد الكائنات الحية الموجودة (بكتريا).



(الشكل–٤٨) جهاز الفوتوكلورميتر Photoclorimeter

ومن أجل القيام بهذه الطريقة لابد بدايةً من معرفة درجة التعكير لمزرعة معيارية، أي لا بد من إجراء عملية العدّ بالأطباق لمزرعة واحدة، توضع باستمرار في المخبر وتُسْتَخدم للحساب و المقارنة وذلك للحصول على المنحني البياني المعياري، الذي يُسْتَخدم فيما بعد لحساب عدد البكتريا حسب كثافتها الضوئية .

لفهم كيفية عمل جهاز الفوتوكلورميتر من الضروري إدراك أن المزرعة البكتيرية Cultre of bacteria تعتبر معلّقاً غروياً، يقوم بامتصاص الضوء عندما يمر خلاله. فعند مجال ضوئي محدد، يكون امتصاص الضوء متناسباً طرداً مع تركيز (عدد) الخلايا البكتيرية.

الطريقة :

الأدوات والمواد اللازمة :

مزرعة من *E.coli* (أو أي مزرعة بكتيرية أخرى)، جهاز الفوتوكلورميتر، حجيرات متخصصة للجهاز Cuvettes، ماصات سعة (٥) مل، حوجلة تحوي على بيئة غذائية معقمة .

الخطوات:

١- القيام بمعايرة الجهاز : وتتم على النحو التالي :

أ – يُشَغّل الجهاز ويُترك (٢٠) دقيقة حتى يصبح جاهزاً للعمل .

ب – تحدد الموجة الضوئية المناسبة وهي (٦٨٦) نانوميتر .

جـ – يضبط الجهاز بحيث يقرأ الصفر على مدرج الأرقام .

٢- يتم ترقيم خمس حجيرات خاصة بالجهاز Cuvettes على النحو التالي (يجب أن تمسك الأنابيب من الجهة الخشنة)

١:١ ، ١:٢ ، ١ : ٤ ، ١ : ٨ ، ١ : ١٦ ، ١ : ١

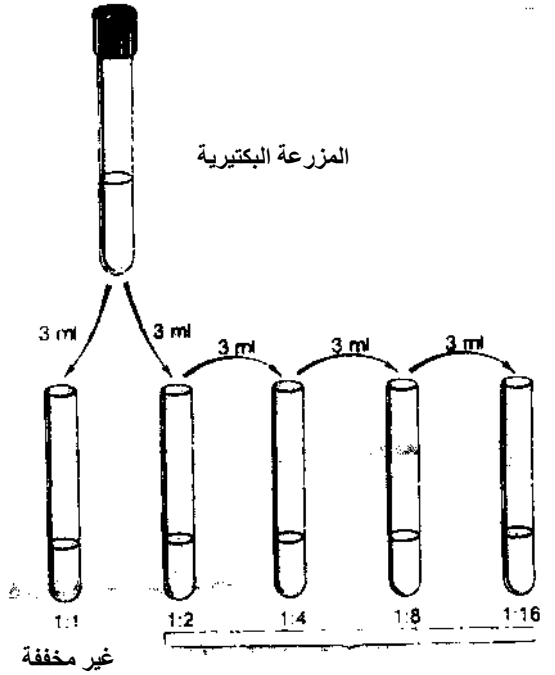
٣- بواسطة ماصة سعة (٥) مل يوضع (٣) مل من البيئة المعقمة بالأنابيب:

١:١ ، ١:٢ ، ١ : ٤ ، ١ : ٨ ، ١ : ١٦ ، ١ : ١ (الشكل-٤٩)

٤ - يتم رجّ مزرعة *E.coli* جيداً . ثم يؤخذ بماصة سعة (٥) مل كمية (٣) مل من المزرعة البكتيرية إلى الأنبوب ١:١، و (٣) مل إلى الأنبوب ١:٢ .

٥- يمزج جيداً محتوى الأنبوب ٢ :١ وذلك باستخدام الماصة وتفريغها من جديد ثلاث مرات.

٦- ينقل (٣) مل من الأنبوب ٢ :١ إلى الأنبوب ٤ :١ ويخلط بنفس الطريقة (ثلاث مرات) ثم ينقل (٣) مل من الأنبوب ٤ :١ إلى الأنبوب ١٦ :١.



(الشكل-٤٩) تحضير التخفيفات للأوعية الخاصة (Cuvettes) بجهاز Photocolormeter

٧- بنفس الوقت يتم إجراء التخفيفات السابقة، لإجراء عملية الزرع بطريقة الأطباق وذلك لمعرفة عدد البكتريا الموجودة في كل تخفيف لاستخدامها في رسم المنحني البياني المعياري .

٨- يتم قياس نسبة مرور أو نفوذ الضوء في الأنابيب الخمسة وذلك بإدخالها بالترتيب في الغرفة (الحجرة) المخصصة للجهاز وتسجل النتائج .

٩- يتم تحويل نسبة الأشعة النافذة إلى كثافة ضوئية Optical density (O.D) باستخدام المعادلة التالية :

$$Do=2-\log \text{ نسبة نفاذ الأشعة}$$

مثال : إذا كانت نسبة نفاذ واحد من الأنابيب تساوي ٥٣.٥ فإن Do تساوي

$$Do = 2 - \log 53,5$$
$$Do = 2 - 1,7284$$
$$= 0,272$$

١٠- تُسجَّل قيم الكثافة الضوئية (O.D) لكل الأنابيب المفحوصة .

ملاحظة :

هناك حالياً أجهزة متطورة في السبكترفتومتر تعطي الكثافة الضوئية (O.D) مباشرة.

يمكن جدولة النتائج وإسقاطها لرسم المنحني البياني على النحو التالي :

التخفيف	نسبة النفوذية Percent transmittance	الكثافة الضوئية Optical density	عدد الأحياء الدقيقة في (١) مل Number of organisms
١:١			
١: ٢			
١: ٤			
١: ٨			
١: ١٦			

خامساً- تقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة بطريقة العدد الأكثر احتمالاً (العدد الأرجح) Most Probable Number (MPN)

وهي طريقة إحصائية تستخدم لدراسة بعض المجاميع الفيزيولوجية للأحياء الدقيقة في التربة مثلاً و ذلك باستخدام بيئات انتخابية Selective media وتحسب أعداد الميكروبات المدروسة من جداول خاصة. يتمثل جوهر هذه الطريقة في زرع (تلقيح) أنابيب الاختبار (أو حتى حوجلات) بكمية محددة بدقة من التخفيفات المعمولة للمعلق المدروس. و بعد التحضين، يُسجّل وجود أو انعدام النمو الميكروبي في الأنابيب أو الحوجلات المزروعة (الملقحة) و بمساعدة جداول خاصة (مثل جدول ماك-كريد) (انظر الجدول-٢) يجري حساب تعداد الخلايا الموجودة في ١ غ (١مل) من المادة الأولية.

الطريقة:

١- يتم إجراء التخفيفات المتتالية Dilution للعينة المدروسة بنفس الخطوات الموضحة بطريقة الأطباق.

٢- يُختار الوسط المغذي المناسب لنمو الأحياء الدقيقة المراد دراستها و يوزّع بكميات متساوية في أنابيب اختبار أو حوجلات و من ثم يُعقّم.

٣- يتم زرع (تلقيح) ٣-٥ أنابيب أو حوجلة بـ ١مل من كل تخفيف بحيث يتوقع ظهور النمو الميكروبي في جميع الأنابيب أو الحوجلات المزروعة (الملقحة) من التخفيفات ذوات التراكيز العالية، إلى أن ينعدم النمو في الأنابيب أو الحوجلات المزروعة من التخفيفات ذوات التراكيز المتدنية.

ملاحظات:

- في حال ظهر النمو الميكروبي في جميع الأنابيب أو الحوجلات فيجب زيادة تعداد التخفيفات و متابعة الزرع (التلقيح) في الأنابيب من التخفيفات ذوات التراكيز المتدنية.
- أما في حال لم يظهر النمو الميكروبي في أيّ من الأنابيب فيجب إجراء الزرع (التلقيح) من التخفيفات ذوات التراكيز العالية.

٤- تحضّن الأنابيب (أو الحوجلات) عند درجة حرارة و زمن بما يتوافق و الاحتياجات الفيزيوبيوكيميائية للميكروبات المطلوب دراستها.

٥- بعد انتهاء زمن التحضين، يتم ملاحظة وجود نمو ميكروبي أو انعدامه؛ فقد يظهر نتيجة النمو الميكروبي عكارة في الأنابيب أو طبقة أو راسب أو غاز أو غيرها من الدلائل الأخرى التي تشير إلى وجود نمو ميكروبي، هذا و قد يتطلب الأمر للاستدلال على النمو الميكروبي إجراء بعض التفاعلات النوعية للكشف عن المنتجات الاستقلابية للميكروبات في الوسط (على سبيل المثال عند نمو بكتيريا النترجة يتم الكشف في الوسط عن النترات و النتريت).

٦- يجري حساب النتائج عن طريق استخدام جداول إحصائية خاصة. و يتم الحصول على القراءة بحيث:

- يُعَبّر الرقم الأول عن عدد الأنابيب (أو الحوجلات) التي ظهر في جميعها النمو الميكروبي و ذلك عند زرعها (تلقيحها) من التخفيف المحدد، و هنا لا بد من تسجيل التخفيف الذي ظهر منه النمو عند زرع الأنابيب (أو الحوجلات) في جميع الأنابيب و أعقبه ظهور النمو في أنابيب (أو حوجلات) محددة فقط.
- يعبر الرقم الثاني و الثالث عن عدد الأنابيب (أو الحوجلات) التي ظهر فيها النمو الميكروبي و التي لم يعقبه ظهور أيّ نمو في الأنابيب (أو الحوجلات) اللاحقة.

و من خلال استخدام جدول ماك-كريد مثلاً يتم معرفة العدد الأكثر احتمالاً، ثم يضرب بمقلوب التخفيف الذي عنده ظهر النمو الميكروبي في جميع الأنابيب (أو الحوجلات) و أعقبه ظهور النمو في أنابيب محددة فقط.

و من خلال سوق المثال التالي سوف يتم توضيح ماسبق بشكل جليّ:

التخفيفات المعمولة	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
عدد الأنابيب أو الحوجلات المزروعة (الملقحة)	٤	٤	٤	٤	٤
عدد الأنابيب التي ظهر فيها النمو الميكروبي	٤	٤	٢	١	٠

و عليه فإن القراءة هي ٤٢١ التي توافق حسب جدول ماك-كريد ٩.٥ (انظر الجدول عند استخدام الأنابيب). و باعتبار أن مستوى التخفيف الذي ظهر عنده النمو الميكروبي في جميع الأنابيب ثم أعقبه ظهور النمو في أنابيب محددة فقط هو عبارة عن 10^{-3} فإن الرقم ٩.٥ يجب أن يُضرب بمقلوب التخفيف أي بـ ١٠٠٠ فتكون النتيجة ٩.٥

× ١٠٠٠=٩٥٠٠ و في حال كانت المادة المدروسة تربة، و يُراد معرفة تعداد إحدى المجموعات الفيزيولوجية فيها كبكتيريا النترجة على سبيل المثال، فإن الرقم ٩٥٠٠ يجب أن يقسّم على وزن ١ غ تربة جافة جفافاً تاماً و عندها يجب أن تُحْسَب رطوبة التربة بالطريقة المعتادة، و بفرض أن رطوبة التربة المدروسة هي ٢٥% فإن وزن ١ غ تربة جافة جفافاً تاماً عبارة عن ٠.٧٥ غ و عليه فإن عدد الخلايا في ١ غ تربة جافة جفافاً تاماً هو :

$$\frac{9.5\times1000}{0.75} = 12666 \text{ خلية}$$

يمكن بطريقة العدد الأكثر احتمالاً (العدد الأرجح) حساب تعداد بعض المجموعات الفيزيولوجية للأحياء الدقيقة الموجودة في التربة. من هذه المجموعات على سبيل المثال:

– بكتيريا النترجة (التأزت) Nitrifiers by MPN Method :

يمكن حساب أعداد بكتيريا النترجة (المرحلة الأولى و الثانية) باستخدام الأوساط الغذائية المنوّه عنها في الفصل العاشر من هذا الكتاب (عندما يجري التطرق عن النترجة). حيث توزّع الأوساط الغذائية بكميات متساوية في حوجلات أو أنابيب اختبار، ثمّ تُعقّم في الصاد الموصد (الأوتوغلاف) عند (١٢١)ْ م مدة (٢٠) دقيقة و تزرع (تلقّح) الأنابيب أو الحوجلات بـ ١مل من التخفيفات المناسبة التي سبق أن حُضّرت. ثم التحضين لمدة (٧-١٤) يوماً عند (٢٥-٣٠)ْ م.

و يمكن الاستدلال على حدوث النمو الميكروبي لبكتيريا النترجة في الأنابيب أو الحوجلات باستخدام كاشف غريس و محلول داي فينيل أمين (انظر الفصل العاشر– النترجة ستجد طريقة الكشف مفصلة) و تحسب أعداد بكتيريا النترجة في ١ غ تربة جافة تماماً باستخدام جداول ماك–كريد بالطريقة التي شُرِحت آنفاً.

– بكتيريا انطلاق النتروجين (عكس التأزت) Denitrifiers by MPN Method:

يمكن حساب تعداد هذه المجموعة الميكروبية باستخدام الوسط المغذي المنوّه عنه في الفصل العاشر (عندما يجري التطرق إلى عملية انطلاق الآزوت). حيث يُوزّع الوسط المغذي بكميات متساوية في أنابيب اختبار تحوي على أنابيب دروهام. ثم تعقم الأنابيب بالصاد الموصد (الأوتوكلاف) عند ١٢١م مدة ٢٠ دقيقة وتُزرع (تلقّح) الأنابيب بـ ١مل من التخفيفات المناسبة التي سبق أن حُضّرت. ثم تحضّن الأنابيب المزروعة (الملقحة) مدة (٥-٦) أيام عند (٢٨-٣٠)ْ م و يستدل على النمو الميكروبي من خلال تجمع الغاز من أنابيب دروهام (انظر الفصل العاشر- انطلاق الآزوت حيث تجد طريقة الكشف مفصلة) و تحسب أعداد بكتيريا انطلاق النتروجين في ١غ تربة جافة تماماً بعد الاستعانة بجداول ماك-كريد.

- البكتريا المثبتة للآزوت الجوي بشكل حر :

Free-Living Nitrogen Fixers by MPN Method

مثل *Clostridium pasteurianum*

يمكن حساب أعداد هذه المجموعة الفيزيولوجية باستخدام الوسط المغذي المنوّه عنه في الفصل العاشر (عندما يجري التطرق إلى تثبيت الآزوت الجوي بشكل غير تكافلي) حيث يوزّع الوسط المغذي بكميات متساوية في أنابيب اختبار تحوي على أنابيب دورهام. ثم يُعقم بالصاد الموصد (الأوتوكلاف) عند (١٢١)ْ م لمدة (٢٠) دقيقة و تزرع (تلقح) الأنابيب بـ ١مل من التخفيفات المناسبة التي سبق و أن حضّرت، ثم تحضّن الأنابيب المزروعة (الملقحة) مدة (٤-٥) أيام عند (٢٨-٣٠)ْ م. و يُسْتَدل على النمو الميكروبي من خلال تجمع الغاز في أنابيب دورهام.

ثم تُحْسَب أعداد هذه المجموعة باستخدام جداول ماك-كريد بالطريقة التي شرحت آنفاً.

العدد الأرجح لخلايا الكائنات الحية الدقيقة في وحدة الحجم
(حسب ماك-كريد)

(جدول –٣)

العدد الأرجح للكائنات الحية الدقيقة عند زراعة (تلقيح) عدد من الأنابيب بشكلٍ موازٍ				القراءة	العدد الأرجح للكائنات الحية الدقيقة عند زراعة (تلقيح) عدد من الأنابيب بشكلٍ موازٍ				القراءة	العدد الأرجح للكائنات الحية الدقيقة عند زراعة (تلقيح) عدد من الأنابيب بشكلٍ موازٍ				القراءة
٥	٤	٣	٢		5	٤	3	٢		٥	٤	٣	٢	
عدد الأنابيب المزروعة (الملقحة)					عدد الأنابيب المزروعة (الملقحة)					عدد الأنابيب المزروعة (الملقحة)				
١.٤	٢.٠	٣.٥	١١٠.٠	٢٢٢	٠.٨	١.١	–	–	١١٢	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠.٠	٠٠٠
–	–	٤.٠	–	٢٢٣	–	١.٣	–	–	١١٣	٠.٢	٠.٢	٠.٣	٠.٥	٠٠١
١٢	١.٧	٣.٠	–	٢٣٠	٠.٦	٠.٨	١.١	٢.٠	١٢٠	٠.٤	٠.٥	–	–	٠٠٢
١.٤	٢.٠	٣.٥	–	٢٣١	٠.٨	١.١	١.٥	٣.٠	١٢١	–	٠.٧	–	–	٠٠٣
–	–	٤.٠	–	٢٣٢	١.٠	١.٣	–	–	١٢٢	٠.٢	٠.٢	٠.٣	٠.٥	٠١٠
١.٤	٢.٠	–	–	٢٤٠	–	١.٦	–	–	١٢٣	٠.٤	٠.٥	٠.٦	٠.٩	٠١١
–	٣.٠	–	–	٢٤١	٠.٨	١.١	١.٦	–	١٣٠	٠.٦	٠.٧	–	–	٠١٢
٠.٨	١.١	٢.٥	–	٣٠٠	١.٠	١.٤	–	–	١٣١	–	٠.٩	–	–	٠١٣
١.١	١.٦	٤.٠	–	٣٠١	–	١.٦	–	–	١٣٢	٠.٤	٠.٥	٠.٦	٠.٩	٠٢٠
١.٤	٢.٠	٦.٥	–	٣٠٢	١.١	١.٤	–	–	١٤٠	٠.٦	٠.٧	–	–	٠٢١
–	٢.٥	–	–	٣٠٣	–	١.٧	–	–	١٤١	–	٠.٩	–	–	٠٢٢
١.١	١.٦	٤.٥	–	٣١٠	٠.٥	٠.٦	٠.٩	٢.٥	٢٠٠	٠.٦	٠.٧	–	–	٠٣٠
١.٤	٢.٠	٧.٥	–	٣١١	٠.٧	٠.٩	١.٤	٥.٠	٢٠١	–	٠.٩	–	–	٠٣١
١.٧	٣.٠	١١.٥	–	٣١٢	٠.٩	١.٢	٢.٠	–	٢٠٢	–	٠.٩	–	–	٠٤٠
٢.٠	٣.٥	١٦.٥	–	٣١٣	١.٢	١.٦	–	–	٢٠٣	–	١.٢	–	–	٠٤١
١.٤	٢.٠	٩.٥	–	٣٢٠	٠.٧	٠.٩	١.٥	٦.٠	٢١٠	٠.٢	٠.٣	٠.٤	٠.٦	١٠٠
١.٧	٣.٠	١٥.٠	–	٣٢١	٠.٩	١.٣	٢.٠	١٣.٠	٢١١	٠.٤	٠.٥	٠.٧	١.٢	١٠١
٢.٠	٣.٥	٢٠.٠	–	٣٢٢	١.٢	١.٦	٣.٠	٢٠.٠	٢١٢	٠.٦	٠.٨	١.١	–	١٠٢
–	–	٣٠.٠	–	٣٢٣	–	٢.٠	–	–	٢١٣	٠.٨	١.٠	–	–	١٠٣
١.٧	٣.٠	٢٥.٠	–	٣٣٠	٠.٩	١.٣	٢.٠	٢٥.٠	٢٢٠	٠.٤	٠.٥	٠.٧	١.٣	١١٠
٢.٠	٣.٥	٤٥.٠	–	٣٣١	١.٢	١.٦	٣.٠	٧٠.٠	٢٢١	٠.٦	٠.٨	١.١	٢.٠	١١١
١٥.٠	–	–	–	٥٢٤	–	٣٠.٠	–	–	٤٣٣	–	٤.٠	١١٠.٠	–	٣٣٢

١٧.٥	–	–	–	٥٢٥	–	٣٥.٠	–	–	٤٣٤	–	٥.٠	١٤٠.٠	–	٣٣٣
٨.٠	–	–	–	٥٣٠	٣.٥	٢٥.٠	–	–	٤٤٠	٢.٠	٣.٥	–	–	٣٤٠
١١.٠	–	–	–	٥٣١	٤.٠	٤٠.٠	–	–	٤٤١	٢.٥	٤.٥	–	–	٣٤١
١٤.٠	–	–	–	٥٣٢	–	٧٠.٠	–	–	٤٤٢	٢.٥	–	–	–	٣٥٠
١٧.٥	–	–	–	٥٣٣	–	١٤٠.٠	–	–	٤٤٣	١.٣	٢.٥	–	–	٤٠٠
٢٠.٠	–	–	–	٥٣٤	–	١٦٠.٠	–	–	٤٤٤	١.٧	٣.٥	–	–	٤٠١
٢٥.٠	–	–	–	٥٣٥	٤.٠	–	–	–	٤٥١	٢.٠	٥.٠	–	–	٤٠٢
١٣.٠	–	–	–	٥٤٠	٥.٠	–	–	–	٤٥٠	٢.٥	٧.٠	–	–	٤٠٣
١٧.٠	–	–	–	٥٤١	٢.٥	–	–	–	٥٠٠	١.٧	٣.٥	–	–	٤١٠
٢٥.٠	–	–	–	٥٤٢	٣.٠	–	–	–	٥٠١	٢.٠	٥.٥	–	–	٤١١
٣٠.٠	–	–	–	٥٤٣	٤.٠	–	–	–	٥٠٢	٢.٥	٨.٠	–	–	٤١٢
٣٥.٠	–	–	–	٥٤٤	٦.٠	–	–	–	٥٠٣	–	١١.٠	–	–	٤١٣
٤٥.٠	–	–	–	٥٤٥	٧.٥	–	–	–	٥٠٤	–	١٤.٠	–	–	٤١٤
٢٥.٠	–	–	–	٥٥٠	٣.٥	–	–	–	٥١٠	٢.٠	٦.٠	–	–	٤٢٠
٣٥.٠	–	–	–	٥٥١	٤.٥	–	–	–	٥١١	٢.٥	٩.٥	–	–	٤٢١
٦٠.٠	–	–	–	٥٥٢	٦.٠	–	–	–	٥١٢	–	١٧.٠	–	–	٤٢٣
٩٠.٠	–	–	–	٥٥٣	٨.٠	–	–	–	٥١٣	٣.٠	١٣.٠	–	–	٤٢٢
١٠٠.٠	–	–	–	٥٥٤	٥.٠	–	–	–	٥٢٠	–	٢٠.٠	–	–	٤٢٤
١٨٠.٠	–	–	–	٥٥٥	٧.٠	–	–	–	٥٢١	٢.٥	١١.٥	–	–	٤٣٠
					٩.٥	–	–	–	٥٢٢	٣.٠	١٦.٥	–	–	٤٣١
					١٢.٠	–	–	–	٥٢٣	٤.٠	٢٠.٠	–	–	٤٣٢

– الأحياء الدقيقة المحللة للسيللوز هوائياً:

يمكن حساب تعداد هذه المجموعة الفيزيولوجية باستخدام الوسط المغذي المنوّه عنه في الفصل العاشر (التحلل الهوائي للسيللوز). حيث يوزّع الوسط المغذي بكميات متساوية في حوجلات و يضاف إلى الوسط ورق الترشيح (السيللوز) الذي يُقصّ على شكل شرائط ويوضع في الحوجلات بحيث يكون جزء من الشريط داخل الوسط المغذي و الجزء الآخر ممتد خارجه بحوالي ٢-٣ سم.

ثم تعقم الحوجلات بالأوتوكلاف عند (١٢١)ْ م لمدة (٢٠) دقيقة و تزرع (تلقّح) الحوجلات بـ ١مل من التخفيفات المناسبة و تحضّن عند (٢٨-٣٠)ْ م لمدة أسبوعين.

يستدل على النمو الميكروبي من خلال الكشف عن الأحياء الدقيقة النامية في الحدّ الفاصل بين هواء الحوجلة و الوسط المغذي، علاوة على أن ورقة الترشيح المستخدمة تصبح مخاطية القوام و ذات لون أصفر تدريجياً مع ازدياد فترة التحضين. تحسب أعداد هذه المجموعة الميكروبية باستخدام جداول ماك-كريد بالطريقة التي شرحت آنفاً.

سادساً- تحديد تعداد الكائنات الحية الدقيقة في الهواء :

لا يعتبر الهواء وسطاً مناسباً لنمو الأحياء الدقيقة، لكنه يحوي الكثير من الأحياء الدقيقة مصدرها التربة، عندما تذروها الرياح، وما تحتويه من عصيات متبوغة وفطريات وخمائر. كما توجد في الأماكن المغلقة مثل : دور الحضانة والمدارس والمصانع ودور السينما والمسرح كائنات دقيقة مُفْرزَة من الأغشية المخاطية للطرق التنفسية العليا للإنسان، مثل البكتريا المسببة لأمراض التيفوئيد والسعال الديكي والسل وغيرها. لهذا يجرى التحليل الميكروبيولوجي للهواء بغية معرفة الكائنات الدقيقة في (١) م^{٣} منه، وللتحري أيضاً عن وجود الكائنات الدقيقة الممرضة وكميتها .

هناك طرق عدة لتحديد تعداد الكائنات الدقيقة في الهواء نذكر منها .

١- طريقة الترسيب على أوساط غذائية صلبة

وهي طريقة بسيطة، تعطي تصوراً تقريبياً عن محتوى الكائنات الدقيقة في الهواء.

المواد والأدوات اللازمة:

أطباق بتري تحوي وسط الآجار المغذي. أو أي وسط غذائي آخر يُختار حسب الهدف من الدراسة.

الطريقة :

١- تُفتح (٣-٥) أطباق بتري تحوي على بيئة غذائية مناسبة (الآجار المغذي مثلاً) في المكان المراد دراسته لمدة (٥) دقائق .

٢- تحضّن الأطباق مقلوبة عند (٢٨- ٣٠) مْ لمدة (٣-٥) أيام .

٣- يجري عدّ المستعمرات النامية . ويتم حساب المتوسط الحسابي لها .

٤- يعتبر العالم أومليانسكي أنه خلال (٥) دقائق وعلى مساحة قدرها (١٠٠) سم^{٢} يمكن أن يكون عدد الأحياء الدقيقة الهابطة على هذه المساحة مساوية لعدد الأحياء الدقيقة الموجودة في (١٠) ليتر هواء (٠.٠١ م^{٣}). ولمعرفة عدد الكائنات الدقيقة في (١)م^{٣} ينبغي معرفة مساحة طبق بتري المستخدم (πr^2). إضافة إلى متوسط عدد الكائنات الحية في أطباق بتري المستخدمة .

مثال: كان متوسط عدد المستعمرات في أطباق بتري (٤٥) مستعمرة. احسب عدد الأحياء الدقيقة في (١)م^{٣} من الهواء المدروس علماً أن أطباق بتري المستخدمة ذوات أقطار (١٠) سم.

مساحة طبق بتري $3,14 \times 52 = 78,5\ Cm^2$

لحساب عدد الخلايا في (100) سم^{٣} [المكافئة لكميتها في (١٠) ليتر أو (٠.٠١ م^{٣} هواء)] نكتب:

كل ٧٨.٥ سم^{٢} فيها ٤٥ خلية
كل ١٠٠ سم^{٢} فيها x

$$x = \frac{100 \times 45}{78,5} = 75$$ خلية في ٠.٠١ م^{٣} هواء

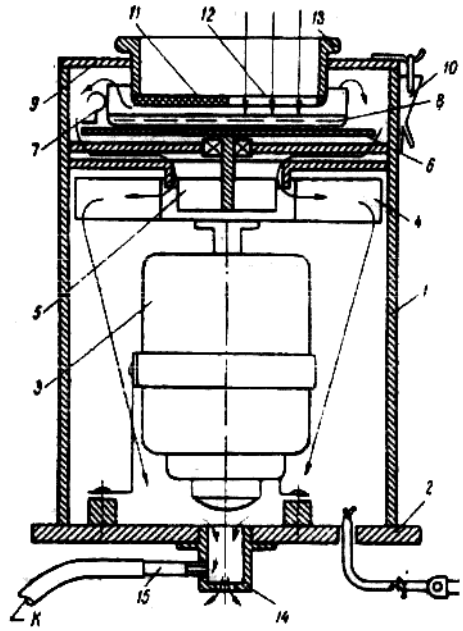
وللتحويل إلى (١)م^{٣} يتم ضرب النتائج بـ١٠٠ فيصبح عندها عدد الخلايا

٥٧ × ١٠٠ = ٥٧٠٠ خلية في (١) م^{٣} هواء .

٢- طريقة كروتوف :

ويستخدم لإجراء هذه الطريقة جهاز خاص (جهاز كروتوف)* الذي يتكون من:

* **هناك أجهزة لتقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة في الهواء متوفرة غير جهاز كروتوف لكنها تعمل بنفس المبدأ.**

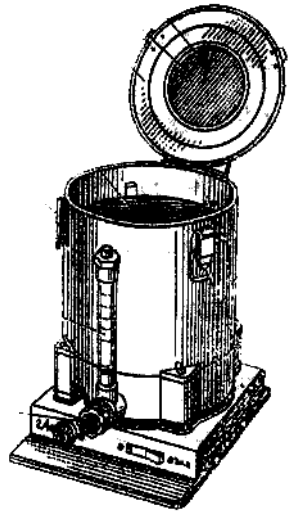


(الشكل–٥٠) جهاز كروتوف (رسم تخطيطي)

أسطوانة (١) لها غطاء متحرك (٩) رُكّب على قاعدة الجهاز (٢) مولّد (٣) تتوضع على نهايته مروحة تدور ١٠٣×٤ ، ١٠٣×٥ دورة/دقيقة (٤) وفوق المروحة يوجد كرسي تحميل على شكل قرص (٦) يوضع عليه طبق بتري الحاوي على البيئة الغذائية المستخدمة (٨). ويتم تثبيت الطبق بثلاثة نوابض (٧). يحتوي غطاء الجهاز قرصاً شفافاً (١١) مزوّداً بشقوق مثلثية الشكل (١٢) يُسحب من خلالها الهواء المراد دراسته . في مركز كتلة الجهاز هناك فتحة (١٤) يخرج الهواء منها إلى أنبوبة (١٥) متصلة مع مقياس ضغط لتحديد كمية الهواء المدروس (المار). (الشكل–٥٠)

عند تشغيل الجهاز يدخل الهواء من خلال الشقوق مثلثية الشكل، الموجودة على غطاء الجهاز (١٢) وذلك بفضل المروحة (٤) وبالتالي فإن الهواء المحمَّل بالكائنات الدقيقة سيصطدم مع سطح البيئة الغذائية. هذا ويمكن معرفة كمية الهواء الداخلة إلى الجهاز عن طريق مؤشر (مونومتر) الذي يمكن برمجته مسبقاً. ويتم تنظيم سرعة الهواء المار ليصبح بحدود (٢٠–٥٠) ليتر في الدقيقة، وهذا بالطبع يتوقف على كمية الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في المكان المدروس. (الشكل–٥١)

عند إجراء تحليل في مكان غير متوقع احتواؤه على كمية كبيرة من الأحياء الدقيقة، يتم تمرير (٥٠) ليتراً في غضون (٢) دقيقة. وبهذه الطريقة يمكن زرع (٢٥) طبقاً خلال ساعة واحدة. إلا أنه عند دراسة هواء ملوث بدرجة كبيرة، فإن الفترة الزمنية يجب أن تتقلص إلى دقيقة واحدة، ذلك لأن عدد المستعمرات النامية على طبق بتري، يجب ألا تزيد عن (٣٠٠) مستعمرة. تُجرى التجربة بأربعة مكررات (لكل موقع مدروس). توضع بعدها الأطباق المزروعة في الحاضنة. يتم من ثم عدّ المستعمرات. وحساب محتوى الهواء من الأحياء الدقيقة في (١)م^{3} وذلك من خلال معرفة كمية الهواء المارة عبر الجهاز .



(الشكل–٥١) جهاز كروتوف (الشكل العام)

الفصل التاسع

مدخل إلى تحديد نوع الأحياء الدقيقة
(الخواص المزرعية والشكلية و الفيزيوبيوكيميائية للأحياء الدقيقة)

يعتبر تحديد نوع الكائنات الحية الدقيقة من المهمات الصعبة في العمل الميكروبيولوجي، حيث يجب أن يؤخذ بعين الاعتبار تكامل مجموعة من الخواص المختلفة لهذه الكائنات والتي هي :

١- الخواص المزرعية أي خواص نمو الأحياء الدقيقة على أو في الأوساط المغذية الصلبة والسائلة.

٢- الخواص الشكلية (المجهرية).

٣- الخواص الفيزيوبيوكيميائية.

٤- التحليل الكيميائي لمكونات الخلية البكتيرية.

٥- دراسة الخواص السيرولوجية.

٦- دراسة التركيب الوراثي للبكتريا (الـ DNA).

٧- تحليل الحمض النووي RNA.

لكننا هنا سنكتفي فقط بدراسة الخواص المزرعية والشكلية والفيزيوبيوكيميائية.

أولاً: الخواص المزرعية :

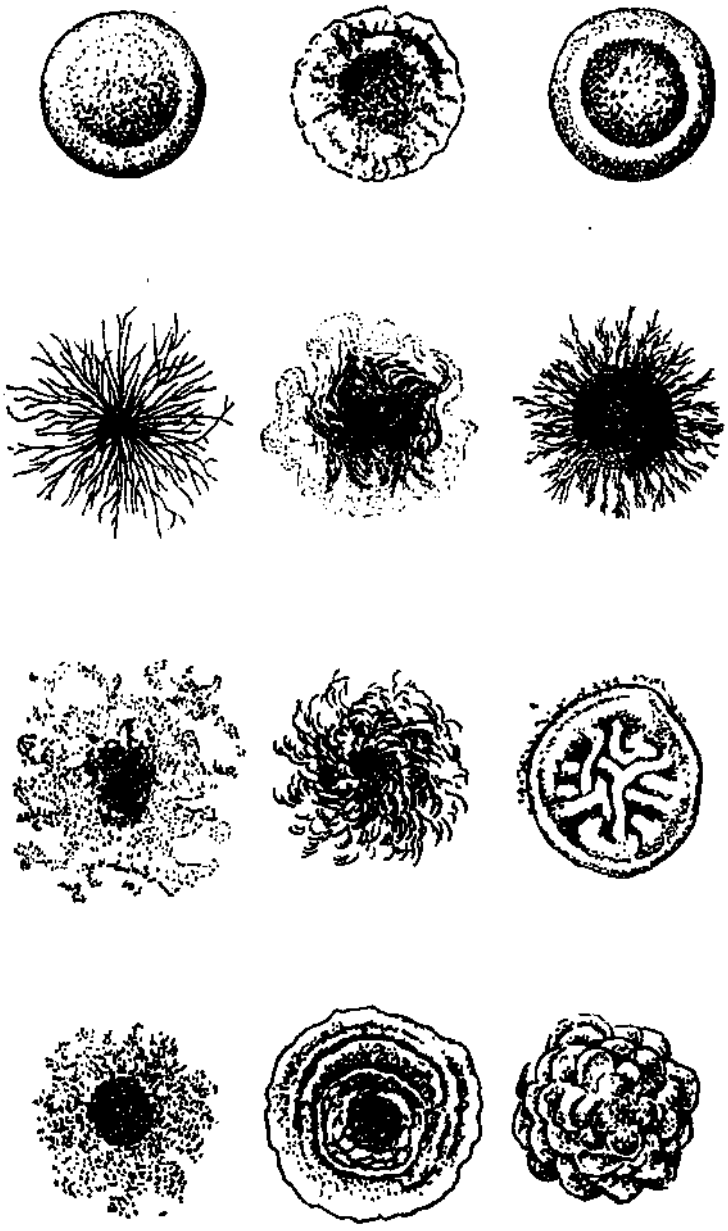
١- النمو على أوساط مغذية صلبة :

في أثناء نمو الأحياء الدقيقة على سطح الأوساط المغذية الصلبة، تتشكل مستعمرات مميزة لكل نوع منها. وينبغي عند وصف المستعمرات الأخذ بعين الاعتبار الصفات التالية :

- **شكل المستعمرة:** هل هو دائري أو أميبي أو اهليجي..؟ ويتم ذلك بالعين المجردة (الشكل-٥٢).

- **قطر المستعمرة** (في ملم) : ويقاس عادة بمسطرة مدرّجة ميليمترية .

- **الخواص الضوئية** : شفافة أم نصف شفافة أو غير شفافة، هل هي لماعة، أو معتمة. ويتم إجراء ذلك بإمرار حزمة ضوئية من خلال الطبق.



(الشكل –٥٢) أشكال المستعمرات

- **اللون** : يجب أن يُسَجّل لون المستعمرة ، وإفرازها أو عدم إفرازها للصبغات.
- **السطح** : هل هو أملس أم خشن ، متجعد وغيرها .....
- **المقطع** : هل هو مستوٍ أو محدب أو منغمس في الآجار ... (الشكل-٥٣) .

(الشكل -٥٣) مقطع المستعمرة

- **حافة المستعمرة** : هل هي منتظمة أو متموجة أو مجذافية ؟ ويتم تحديد ذلك باستخدام المجهر عند التكبيرات الضعيفة .(الشكل-٥٤) .

(الشكل -٥٤) أشكال حافة المستعمرة

- **القوام** : هل هو زيتي أم عجيني ؟ لزج أم قاسٍ؟ ويتم تحديد القوام عن طريق لمس الإبرة اللاقحة بسطح المستعمرة.

يمكن تتبع الخواص المزرعية من خلال نمو الكائنات الدقيقة عند استخدام طريقة التخطيط على الآجار المائل:

حيث يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة والمبرّدة جزء من المستعمرة المدروسة ويجرى تخطيطها (نشرها على سطح الآجار المائل بشكل متموجّ) وبعد التحضين يتم فحص شدة النمو: فإما أن يكون طفيفاً أو متوسطاً أو شديداً.كما تفحص الحواف فهي إما منتظمة أو متموجّة. كما يُسَجّل اللون،والقوام وخواص السطح .

تجدر الإشارة إلى أنه من المهم للغاية عند وصف المستعمرات ونمو الأحياء الدقيقة بطريقة التخطيط على الآجار المائل، التنويه إلى مكونات الوسط المغذي وعمر الخلايا، ذلك باعتبار أن مستعمرات النوع الواحد يمكن أن تسلك سلوكاً متبايناً تبعاً للوسط المغذي المستخدم وتبعاً لعمر الخلايا . تُجْرى طريقة التخطيط على الآجار المائل باستخدام وسط الآجار المغذي.

٢- النمو في الأوساط المغذية السائلة :

عند نمو الكائنات الحية الدقيقة في الأوساط المغذية السائلة تتشكل إما رواسب أو أغشية كما يمكن أن يتعكر الوسط. ويُشار عند دراسة خواص النمو في الأوساط السائلة إلى:

شدة النمو: فإما أن يكون طفيفاً أو معتدلاً أو شديداً .

عكارة الوسط: هل هي متجانسة أم لا.

وفي حال تشكل طبقة على شكل غشاء يجب التنويه إلى شكل ومواصفات هذا الغشاء : هل هو حلقي أو متراص أو رقيق أو سميك أو كثيف أو رخو، أو أملس أو متعرج، أو مخاطي، أو عائم، أو مترسب؟. وفي حال تشكل راسب يجب تحديد خواصه أيضاً؛ هل هو طفيف أو شديد أو رخو أو سميك أو قطني المظهر أو حبيبي أو مخاطي؟.

ثانياً- الخواص الشكلية (المجهرية):

وقد تم شرح طريقة إجرائها مفصلاً في الفصل الخامس والسادس وهي :

١- شكل الخلية (عصوي، كروي، خيطي، حلزوني، لولبي...) وأبعادها.

٢- نظام (طريقة) تجمع الخلايا : إفرادي ، ثنائي ، سبحي ، عنقودي ....

٣- الحركة موجودة أم غير موجودة .

٤- توضّع وعدد السياط .

٥- تشكّل الأبواغ و نوع التبّوغ : أبواغ داخلية ، أبواغ ساكنة Cystes.

٦- توضّع الأبواغ : طرفي ، مركزي ، بالقرب من الطرف ....

٧- تشكّل المحافظ .

٨- المواد الادخارية .

٩- علاقتها بصبغة غرام .

١٠- خاصية المقاومة للأحماض .

ثالثاً- الخواص الفيزيوبيوكيميائية :

يستخدم على نطاق واسع في أثناء تحديد نوع الأحياء الدقيقة بعض خواصها المتعلقة بالتبادل الغذائي، والتي يمكن إظهارها عن طريق معرفة قدرة الكائن الحي الدقيق على النمو في أوساط انتخابية أو مقدرته على تحويل (استخدام) هذه المادة أو تلك الداخلة في تركيب هذه الأوساط، أوتأثره بهذا العامل الخارجي أو ذاك. وسنسوق بعض الخواص الفيزيوبيوكيميائية التي تستخدم في العادة عند تحديد المكان التصنيفي للبكتريا:

١- القدرة على استخدام المواد الكربوهيدراتية والكحولات :

تتميز الكائنات الدقيقة باختلاف قدرتها على استخدام المواد الكربوهيدراتية والكحولات كمصدر وحيد للكربون والطاقة. ولتحديد أنواع غالبية الأحياء الدقيقة غير ذاتية التغذية Hetrotrophic من الضروري معرفة وتحديد أيّ المواد الكربوهيدراتية والكحولات التي تضمن نمو الكائن الحي الدقيق المدروس. وما هي تغيرات الوسط المرافقة لنموه. وكقاعدة عامة، تُستخدم المواد الكربوهيدراتية التالية: أرابينوز،كسيلوز، غلوكوز، فركتوز ، غالاكتوز،سكروز، مالتوز، لاكتوز وكحولات مثل : غليسرين ومانيت. علماً أن نمو الأحياء الدقيقة على الأوساط المحتوية على هذه المركبات يمكن أن يقود إلى تراكم الأحماض العضوية ومنتجات قلوية وتَشَكُّل غاز.

تُحدّد حموضة الوسط عن طريق قياس pH . أما الغاز فيلاحظ بظهور فقاعات وتجمع الغاز في أنابيب درهام Durham tube [وهي عبارة من أنبوبة صغيرة بقطر (٥ – ٧) ملم ، وطول (٣.٥ – ٤.٥) سم مسدودة في إحدى النهايات].

الطريقة :

١- يحضـرّ الوسـط الأساسـي الـذي يحـوي (% مـاء مقطـر): ٠.٥ بيتـون و ٠.١ K_2HPO_4

٢- لإظهـار تغـيرّ pH الوسـط، يضـاف المشـعربروم تيمـول الأزرق (لونـه أصـفرعند pH= 6 ويصبح أزرق عند pH=7.6) إلى الوسط الأساسي ثم يُضْبَط pH الوسط عند ٦.٨.

٣- يوزّع الوسط الأساسي في أنابيب الاختبار (التي تحتوي على أنابيب درهام) بواقع (٩) مل في كل أنبوب ويُعقم عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠) دقيقة .

٤- تضـاف المـواد الكربوهيدراتيـة أو الكحـولات إلى الوسـط الأساسـي بنسـبة ١% ويُنْصح بتعقيم المواد الكربوهيدراتية والكحولات بشكل مستقل بالفلترة (الترشيح) أو بالتعقيم بالطريقة التندلية .

٥- يُنقل (٠.١ – ٠.٢) مل من المعلّق المراد دراسته إلى الوسط المغذي .

٦- تحضّن الأنابيب .وتُسَجّل النتائج بعد (٤٨ – ٩٦) ساعة في حال لوحظ أن نمو الكائن الحي الدقيق المدروس سريعاً،أو بعد (٧– ١٠) أيام في حال كان نموه بطيئاً.

٧- يوضع كشاهد، أنبوب اختبار يحوي على الوسط الأساسي المضاف إليه المشعر ولكن دون إضافة أي مادة كربوهيدراتية أو كحولية .

النتائج :

تتم مقارنة النتائج مع الشاهد و :

– يلاحظ بالعين المجردة وجود النمو من عدمه، فإذا تَعَكّر الوسط وتشكل غشاء أو راسب فهذا يعني وجود نمو والعكس صحيح .

– يلاحظ تغيّر لون المشعر : وتُسَجَّل النتيجة، هل ترافق استخدام الكربوهيدرات والكحولات بتغير pH الوسط ؟

– يسجّل تجمع الغاز في أنابيب درهام .

وعلى أساس النتائج المتحصل عليها يمكن معرفة أي المواد الكربوهيدراتية أو الكحولية المستخدمة من قبل الكائن الحي الدقيق المدروس. وهل يرافق هذا الاستخدام تراكمٌ لحموضٍ معينة أو تشكلٌ لغاز ؟

يمكن تسجيل النتائج وفقاً للجدول التالي :

المواد الكربوهيدراتية أو الكحولات	تعكر الوسط تشكل الغشاء تشكل راسب	تشكل غاز	pH الوسط		
			حامضية	قلوية	بدون تغيير
أرابينوز كسيلوز غلوكوز . .					

٢- حلمهة النشاء :

يتم حلمهة النشاء من قبل الكائنات الحية الدقيقة المفرزة للأميلاز والمستخدمة لمنتجات حلمهة النشاء كمصدر للمواد الكربوهيدراتية والطاقة. ولإظهار هذه الخاصية يتم اتباع ما يلي :

الطريقة:

١- يحضر الوسط المغذي التالية (% ماء مقطر) ببتون-١، $0.5\text{-}KH_2PO_4$، نشاء ذوّاب-٠.٢، آجار-آجار ١.٥، 7- 6.8 = pH. يعقم الوسط عند (١٢١) ْم لمدة (٢٠) دقيقة.

٢- يوزّع الوسط المغذي في أطباق بتري .

٣- تزرع خلايا الكائن الدقيق المدروس المراد معرفة قدرته على حلمهة النشاء في أطباق بتري بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة والمبرّدة على شكل خط على طول قطر الطبق .

٤- تحضّن الأطباق لمدة (٧ – ١٠) أيام .

النتيجة :

في حال تحلمه النشاء يصبح لون الوسط المجاور للخط المزروع بالعينة المدروسة فاتحاً. ويمكن الكشف عن حلمهة النشاء أيضاً عن طريق استخدام محلول لوغول الذي يُصب على كامل طبق بتري فيتلون الطبق كله بلون أزرق باستثناء المنطقة التي جرى فيها حلمهة النشاء، حيث تبقى غير ملوّنة. أو يمكن أن تكتسب لوناً أحمر فاقعاً في حال تحلمه النشاء بشكل أساسي إلى ديكسترين.

٣- تمييع الجيلاتين :

تعتبر تمييع الجيلاتين صفة مميزة للأحياء الدقيقة المفرزة في الوسط لأنزيمات الجيلاتيناز Gelatinase .

الطريقة :

١- يُحضَّر وسط الجيلاتين المغذي Nutriant Glatin .

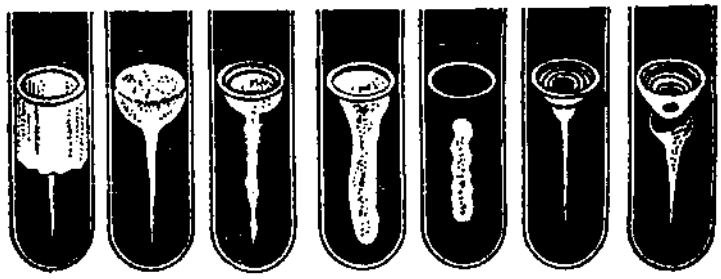
٢- يوزّع الوسط في أنابيب اختبار بواقع (٨-١٠) مل في كل أنبوب ثم يعقم في الصاد الموصد عند (١١٥)مْ لمدة (١٥) دقيقة (يُفضل تعقيمه في جهاز أرنولد).

٣- يتم زرع العينة المدروسة بطريقة الوخز .

٤- تُحَضَّن الأنابيب المزروعة لمدة (٧-١٠) أيام عند (٢٠-٢٣)مْ .

النتيجة :

يُسجّل تمييع الجيلاتين من عدمه بصريّاً. وفي حال كان هناك تمييع للجيلاتين، يُشَار إلى شدته وشكل إسالته ، فيمكن أن يُسال الجيلاتين بشكل قمعي أو طبقي أو حبيبي أو إسفنجي. (الشكل-٥٥) .



(الشكل –٥٥) أشكال إسالة (تمييع) الجلاتين

٤– تشكل الأمونيا :

يمكن الكشف عن هذه الخاصية عند الكائنات الحية الدقيقة على النحو التالي.

الطريقة :

١- يحضر وسط المرق المغذي Nutrint broth و يوزّع في أنابيب اختبار بواقع (٨-١٠) مل في كل أنبوب.ويعقم في الصاد الموصد عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠)دقيقة.

٢– توضع أوراق عباد الشمس في طبق بتري وتُلف جيداً وتعقم في الصاد الموصد.

٣- تلقح أنابيب الاختبار بالمادة المدروسة .

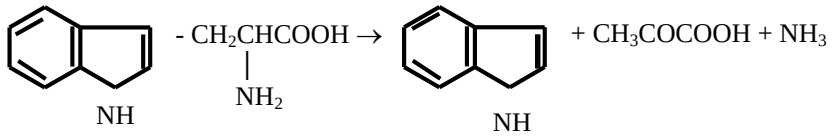
٤– توضع ورقة عباد الشمس الحمراء المعقمة بين جدار أنبوب الاختبار والغطاء القطني.

النتيجة :

في حال تشكل الأمونيا يلاحظ ازرقاق لون ورقة عباد الشمس.

٥– تشكل الأندول :

تحوّل الكثير من الكائنات الحية الدقيقة في سياق نموّها التربتوفان إلى أندول. في حين لا تملك كائنات أخرى هذه الخاصية.



أندول

الطريقة :

١- يجهز وسط المرق المغذي ويضاف إليه ٠.٠١ % تربتوفان .

٢- يوزع الوسط في أنابيب اختبار بواقع (٨-١٠) مل في كل أنبوب. ويعقم عند (١١٥) مْ لمدة (٣٠) دقيقة.

٣- تزرع أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط السابق مع التربتوفان بالمادة المدروسة.

٤- يترك أحد أنابيب الاختبار دون زرع.

٥- بعد (٥-٧) أيام من الزرع يجرى اختبار تشكل الأندول بواسطة كاشف كوفاك Kovac's Reagent حيث يوضع (١-٢) مل من كاشف كوفاك على سطح أنابيب الاختبار بدون أن نقوم بخلط الكاشف مع الوسط.

النتيجة :

في حال ظهر لون أحمر في الأنابيب المزروعة يكون ذلك دليلاً على وجود الأندول حيث تقارن النتائج عادة مع أنبوب الاختبار الشاهد .

من الجدير بالذكر فإن هذا الاختبار يستخدم للتفريق بين بكتريا، *Enterobacter aerogenes* و *Escherichia coli* حيث تنتج الأولى الأندول بينما الثانية غير منتجة له.

يتكون كاشف كوفاك Kovac's Reagent من باراداي ميتيل أمين بنزالدهيد (١) غ Paradimethylaminobenzaldehyde وكحول إميلي Amyl alcohol (١٥) مل. وحمض كلول الماء المركز (١٠) مل.

٦- تشكل كبريت الهيدروجين :

تستخدم بعض الأحياء الدقيقة في سياق عملياتها الاستقلابية الأحماض الامينية المحتوية على الكبريت مثل المثيونين.

الطريقة :

١- يجهز وسط المرق المغذي. ويوزّع في أنابيب بواقع (٨-١٠)مل في كل أنبوب.ويعقم بالصاد الموصد عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠) دقيقة .

٢- تزرع الأنابيب بالكائن الحي الدقيق المراد دراسته.

٣- يوضع فوق الوسط ورقة ترشيح مشبعة بخلات الرصاص، محصورةً بين الغطاء القطني وجدار أنبوب الاختبار. (الشكل-٥٦)

٤- تحضّن أنابيب الاختبار المزروعة لمدة (٧-١٠) أيام.

النتيجة :

يمكن الكشف عن انطلاق H_2S من خلال تشكل كبريتات الرصاص، حيث تسود ورقة الترشيح المشبعة بخلات الرصاص.

تحضّر الأوراق المشبعة بخلات الرصاص على النحو التالي : تُقَص قطعٌ طولانية من أوراق الترشيح، وتُغمَس لمدة (٥- ١٠) دقائق بمحلول مائي من خلات الرصاص ٥% $Pb(CH_3COO)_2$ثم تجفف في الهواء وتعقّم بالصاد الموصد (الأوتوكلاف) بعد وضعها في طبق بتري وتغليف الطبق، وذلك عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠) دقيقة.

(الشكل-٥٦) طريقة وضع ورقة الترشيح المشبعة بخلات الرصاص فى أنبوب

٧- إرجاع النترات :

للكائنات الحية الدقيقة المحتوية على أنزيم نيتراتريدوكتاز القدرة على إرجاع النترات إلى نتريت مستخدمة النترات كمصدر للآزوت. كما أن لبعض الكائنات الحية الدقيقة القدرة على إرجاع النتريت إلى أزوت جزيئي N_2 مستخدمة النترات كمستقبل للهيدروجين (الإلكترونات) عند أكسدة المركبات العضوية .

الطريقة :

١- يحضر وسط المرق المغذي الذي يضاف إليه ٠.٢% من KNO_3 .

٢- يوزّع الوسط المغذي في أنابيب الاختبار بواقع (٨-١٠) مل في كل أنبوب.

٣- تُغطّس في الوسط أنابيب دروهام. وتعقم أنابيب الاختبار في الصاد الموصد عند (١٢١) ْم لمدة (٢٠) دقيقة.

٤- تزرع أنابيب الاختبار بالمادة المدروسة وتحضّن عند درجة حرارة مناسبة لمدة (٧-١٠) أيام ثم تسجّل النتائج .

النتيجة :

أ- يمكن الكشف عن النتريت باستخدام كاشف غريس* : حيث يضاف إلى قطرة منه، قطرة من المزرعة المدروسة،ويدلّ ظهور اللون الأحمر على وجود النتريت.

ب- يمكن الكشف عن إرجاع النتريت إلى آزوت جزيئي N_2 عن طريق ملاحظة تجمع الغاز في أنابيب درهام.

٨- النمو على وسط خالٍ من الآزوت :

تنمو على هذه الأوساط عادة البكتريا القادرة على تثبيت الآزوت الجوي. ولإظهار هذه الخاصية عند البكتريا هذه تُتَّبع الطريقة التالية :

الطريقة :

١- يحضّر الوسط المغذي التالي(غ/ ليتر واحد ماء مقطر) :

مانيت-٢٠ ؛ $0.2\text{-}K_2HPO_4$ ؛ $0.2\text{-}MgSO_4$ ؛ ٠.٢- NaCl ؛ $5\text{-}CaCO_3\text{-}K_2SO_4$ ؛ آجار-١٥.

٢- يوزّع الوسط في أنابيب اختبار بحيث تحتل $\frac{1}{3}$ الأنبوب فقط، وتُعقم في الصاد الموصد عند (١١٥) ْم لمدة (٢٠) دقيقة. وبعد التعقيم تجهز أنابيب الآجار المائل.

٣- يتم زرع العينة المدروسة بطريقة التخطيط على سطح الآجار المائل. وتحضّن الأنابيب لمدة (٧-١٠) أيام.

النتيجة :

بعد انتهاء مدة التحضين يشاهد بالعين المجردة نمو أو انعدام نمو البكتريا .

٩- النمو على وسط تركيبيّ خالٍ من عوامل النمو :

يستخدم هذه الوسط للوقوف على مدى احتياجات العينة المدروسة إلى عوامل نمو خاصة مثل الفيتامينات والهرمونات وغيرها .....

الطريقة:

* أنظر طريقة تحضير كاشف غريس في الفصل العاشر ، فقرة النترجة (التأزت)

١- يحضّر الوسط المغذي التالي (غ / ليتر واحد ماء مقطر): غلوكوز-٣؛ 0.3- NH_4NO_3 ؛ $0.1-KH_2PO_4$ ؛ $0.05-MgSO_4$ ؛ ٠.٠٥-NaCl ؛ $0.5-CaCO_3$ ؛ $FeSO_4$: كمية قليلة جداً ؛ آجار- ١٥.

٢- يوزّع الوسط في أنابيب اختبار بحيث يحتل $\frac{1}{3}$ الأنبوب ويعقم بالصاد الموصد عند (١١٥)مْ لمدة (٢٠) دقيقة. ثم تجهز أنابيب الآجار المائل .

٣- تزرع العينة المدروسة بطريقة التخطيط على سطح الآجار المائل. وتَحَضّن الأنابيب لمدة (٧- ١٠) أيام.

النتيجة :

بعد انتهاء التحضين يُسجّل وجود أو انعدام النمو.

١٠- التأثير في الحليب :

يحتوي الحليب على مواد كربوهيدراتية (لاكتوز) وبروتينات (كازائين)، وفيتامينات وأملاح معدنية لذلك يعتبر وسطاً مناسباً لنمو الكثير من الكائنات الدقيقة. يمكن أن يرتبط نمو الأحياء الدقيقة في الحليب بتخمر اللاكتوز أو بتخثير أو (تحليل) الكازئين أو بكلتا العمليتين معاً. ولتحديد تأثير الأحياء الدقيقة في الحليب تجرى الطريقة التالية:

الطريقة :

١- يتم التخلص من دهن الحليب بإجراء عملية الطرد المركزي لمدة (١٥) دقيقة عند (٢-٣) ألف دورة / دقيقة.

٢- يمدّد الحليب خالي الدسم بالماء بنسبة: ٤ أجزاء حليب إلى جزء واحد ماء.

٣- يُضاف إلى الحليب مشعر عباد الشمس (لكل ليتر واحد يضاف ١٠مل من المشعر ٤ %).

٤- يُوزَّع الحليب في أنابيب اختبار بواقع (٨-١٠) مل في كل أنبوب ويعقم بالصاد الموصد (١١٥) ْم لمدة (٢٠) دقيقة ويُفَضَّل تعقيمه في جهاز أرنولد.

٥- تُزرع الأحياء الدقيقة المراد دراستها في هذه الأنابيب. ويُسَجَّل تأثير هذه الكائنات في الحليب بعد (٧- ١٠) أيام .

النتيجة :

آ- يُسَجَّل استخدام اللاكتوز وتشكل الحمض من قبل الكائن الحي الدقيق المدروس عن طريق تَغَيّر لون المشعر .

ب- في حال كانت الحموضة مرتفعة يلاحظ تجمع للكازئين (تشكّل خثرات). وغالباً ما يترافق ذلك مع فصل للمصل.

حـ- يمكن ملاحظة تشكل CO_2 من خلال انطلاق الفقاعات.

ء - إن تأثير الأحياء الدقيقة على الكازئين يسبب أيضاً تخثر الحليب، وذلك نتيجة لإفراز هذه الأحياء للأنزيمات المحللة للكازئين و عند وجود نشاط كبير لهذه الأنزيمات يمكن أن يلاحظ انعدام لون الحليب .

١١- اختبار الكتالاز :

إن لمعظم الأحياء الدقيقة الهوائية نشاط كتالازي واضح، في حين لا تنتج هذا الأنزيم الأحياء الدقيقة اللاهوائية إجبارياً وكذلك الكثير من الأحياء الدقيقة شحيحة الأكسجين Microaerophilic .

يقوم الكتالاز ، بتحليل فوق أوكسيد الهيدروجين إلى أكسجين وماء وفق ما يلي :

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{كتالاز}} 2H_2O + O_2$$

الطريقة:

١- يُنْشَر الكائن الحي الدقيق المدروس بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة والمبرّدة على سطح شريحة زجاجية .

٢- يوضع قطرة من محلول H_2O_2 ، ١٠% على المادة المدروسة.

النتيجة :

إن انطلاق فقاعات غازية (O_2)، يدل على وجود الكتالاز في الخلايا المدروسة.

يمكن أيضاً تنمية الكائن الحي الدقيق المدروس في وسط سائل ويُضاف (١) مل

من H_2O_2 ويُسَجَّل انطلاق الغاز من عدم انطلاقه .

١٢- اختبار أحمر المثيل Methyl red test :

يستخدم هذا الاختبار للتفريق بين البكتريا المنتجة للحمض في الوسط المغذي من تلك التي لا تنتج الحموض. ويستخدم هذا الاختبار عادة عند التحليل البكتيري للمياه للتفريق بين *E.coli* و *Enterobcter arogenes*. حيث تنتج الأولى كمية من الحمض تكفي لتغيير لون المشعر (أحمر الميثيل) فيصبح أحمر، بينما الثانية لا تنتج من الحمض ما يكفي لتغيير لون المشعر، فيبقى أصفر.

الطريقة :

١- يُحضّر وسط مرق سكر الغلوكوز Glucose broth ويُوزّع في أنابيب اختبار.

٢- تزرع أنابيب الاختبار بالكائنات الدقيقة المدروسة، ويُترك أحد الأنابيب بدون زرع كشاهد.

٣- تحضّن الأنابيب عند (٣٧) مْ ولمدة (٢-٥) أيام .

٤- يضاف(٥) نقاط من كاشف أحمر الميثيل إلى الأنابيب المزروعة، ويُمزج بشكل جيد.

النتيجة :

يدلّ تلوّن الأنابيب المزروعة باللون الأحمر على إيجابية الاختبار. بينما يدل تشكل اللون الأصفر على سلبيته.

يتكون وسط سكر الغلوكوز من هضمون (ببتون) -٧غ، سكر الغلوكوز-٥غ؛ 5- غ K_2HPO_4 ؛ ماء مقطر ١٠٠٠ مل .

١٣- اختبار فوجيس بروسكاير Voges- Proskauer test:

يقوم هذا الاختبار على أساس أن لبعض البكتريا القدرة على تكوين مركب الأستيل ميتل كاربينول Acetyl methyl carbinal في الوسط المحتوي على الغلوكوز والببتون (وسط مرق سكر الغلوكوز) حيث يعمل هذا المركب على تعادل الحموض الناتجة في الوسط وبذلك تتفادى البكتريا تأثير الوسط الحامضي.

الطريقة :

١- يُوزّع وسط مرق سكر الغلوكوز Glucose broth في أنابيب اختبار.

٢- تزرع الأنابيب بالبكتريا المدروسة، ويُترك أحد الأنابيب بدون زرع كشاهد .

٣- تُحضَّن الأنابيب المزروعة عند (٣٧) م لمدة (٤٨) ساعة .

٤- يُضاف إلى الأنابيب (١) مل من محلول ماءات الصوديوم (٤٠ %) يحتوي على (٣٠ %) كرياتين ثم بضع نقاط من محلول (٥ %) α-naphthol (ألفا نفتول). ويتم المزج بشكل جيد وبعد (٢-٤) ساعة تسجّل النتائج .

النتيجة :

يتكوّن اللون الأحمر في الأنابيب المحتوية على أستيل ميتيل كاربينول .

١٤- اختبار السترات Citrate test

يستخدم هذا الاختبار أيضاً للتفريق بين *E.coli* و *E.aerogenes* حيث تستطيع الأخيرة استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون، في حين ليس لل *E.coli* القدرة على ذلك وبالتالي لا تستطيع النمو على مثل هذه الأوساط .

الطريقة :

١- يُوزّع وسط السترات في ثلاثة أنابيب، يُزرع الأنبوب الأول بعينة من *E.coli* ، ويُزرع في الأنبوب الثاني عينة من *E.aerogenes* بينما يُترك الأنبوب الثالث بدون زرع كشاهد.

٢- تحضّن الأنابيب عند (٣٧)مْ لمدة (٤) أيام .

النتيجة :

في حال تعكّر أحد الأنابيب، دلّ ذلك على وجود *E.aerogenes*.

يتكون وسط آجار السترات من: مستخلص الخميرة ٠.٥ غ ، سكر الغلوكوز ٠.٢ غ، ملح كلور السيستينيوم ٠.١ غ ، ملح فوسفات وحيد البوتاسيوم KH_2PO_4 ١ غ

، كلور الصوديوم ٥ غ ، سترات الصوديوم ٣ غ ، دليل أحمر الفينول ٠.٠٢ غ ، آجار ١٢ غ ، ماء مقطر ١٠٠٠ مل .

١٥- تأثير رقم حموضة الوسط (درجة التشرد الهيدروجيني) :

لدراسة علاقة الأحياء الدقيقة برقم حموضة الوسط يتم اتباع ما يلي :

الطريقة :

١- يحضّر وسط المرق المغذي. وتضبط درجة حموضته عند (٤- ٣.٦) ، (٤.٥-٩.٢) (أعلى من ٩.٢)

٢- يوزّع الوسط في أنابيب الاختبار تبعاً لدرجة الحموضة .

٣- تزرع أنابيب الاختبار بالكائنات الحية الدقيقة المدروسة.ثم تحضّن عند (٢٨-٣٠)مْ لمدة (٨-١٠) أيام .

النتيجة :

يمكن من خلال ملاحظة شدة نمو الكائنات الدقيقة معرفة درجة الحموضة المثالية اللازمة لنمو الكائن الدقيق .

١٦- تأثير الأوكسجين (انظر الفصل الرابع):

١٧- تأثير درجة الحرارة :

كما هو معروف فإن الكائنات الحية الدقيقة تقسم تبعاً لعلاقتها بالحرارة إلى: أحياء دقيقة محبة للحرارة Thermophiles وأخرى محبة للبرودة Psychrophiles وثالثة متوسطة المحبة للحرارة Mesophiles . ولكل كائن حي دقيق درجة حرارة مثالية يكون فيها نموّه على أَشُدِّه. ودرجة حرارة صغرى والتي هي أقل درجة حرارة يمكن للكائن الدقيق النمو عندها، ودرجة حرارة قصوى : وهي أعلى درجة حرارة يمكن للكائن أن ينمو عندها.

الطريقة :

١- يُفضّل عند دراسة تأثير درجة الحرارة استخدام الأوساط المغذية السائلة مثل المرق المغذي Bouillon broth. حيث توزَّع في أنابيب اختبار وتعقم عند (١٢١) م لمدة (٢٠) دقيقة.

٢- تزرع الأنابيب بالكائن الحي الدقيق المدروس. ويتم تحضين الأنابيب عند درجات حرارة مختلفة (٥ ، ٢٥ ، ٣٥ ، ...) ْم .

٣- بعد انتهاء فترة التحضين (٢-٣ يوم). يلاحظ شدة نمو الكائن الحي الدقيق المدروس وتُسجل النتائج .

النتيجة :

تسجل النتائج على النحو التالي: في حال انعدام النمو- ، نمو ضعيف+ ، نمو جيد++ ، نمو شديد+++.

١٨- تأثير كلوريد الصوديوم :

معظم البكتريا تبدي حساسية لتراكيز كلوريد الصوديوم بالمقارنة مع الفطريات. بيد أن الأنواع البكتيرية تختلف فيما بينها بدرجة تأثرها بهذا العامل. ولمعرفة علاقة الكائن الدقيق بتراكيز كلوريد الصوديوم المستخدمة يمكن اتباع ما يلي:

الطريقة:

١- يحضر وسط المرق المغذي بحيث يحتوي على تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم (١ %، ٢.٥ % ، ٣.٥ %، ٦.٥ %) و يُوزّع في أنابيب اختبار ويُعقّم عند (١٢١)ْ م لمدة (٢٠) دقيقة. وتسجّل تراكيز كلوريد الصوديوم على السطح الخارجي للأنابيب.

٢- تزرع الأنابيب بالكائن الدقيق المدروس . وبعد (٦-١٠) أيام تدوّن النتائج.

النتيجة :

تسجل النتائج على النحو التالي : انعدام النمو -، نمو ضعيف + ، نمو جيد ++، نمو شديد +++.

١٩- تأثير بعض العوامل الأخرى:

آ- تأثير المعادن

كما هو معروف فإن نجاح الحشوات المعدنية المستخدمة في حماية الأسنان من النخز لفترة طويلة، يقوم على أساس الفعل السام للمعادن على البكتريا، حيث تتألف الحشوات كميات قليلة من مزيج الفضة مع الزئبق، وهذه كفيلة بحماية الأسنان لفترة طويلة، إلا أن الفعل السام لهذه المواد قد يؤثر على المريض ويحدث له سمّية مع الوقت. وهناك معادن ثقيلة أخرى تمتلك هذا الفعل القاتل على البكتريا، وتستخدم في تعقيم المياه، والمراهم، ومعاملة الضماد والشاش المستخدم في المجال الطبي.

سنتناول في هذا الاختبار دراسة تأثير ثلاثة معادن هي: النحاس والفضة والألمنيوم وملاحظة الفروقات في فعلها السميّ على احد الأنواع البكتيرية وهي *E.coli*.

المواد و الأدوات اللازمة:

طبق بتري معقم؛ أنبوب يحوي وسط الآجار المغذي؛ ملاقط؛ حمام مائي؛ كحول حامضي؛ مزرعة سائلة تحوي بكتريا *E.coli*؛ ثلاثة أقراص معدنية مصنوعة من النحاس، الفضة، الألمنيوم

طريقة العمل :

١- يتم إذابة الوسط المغذي المستخدم والاحتفاظ به سائلاً في حمام مائي مضبوط عند درجة الحرارة ٥٠م .

٢- يُلقح الوسط المغذي بيكتريا *E.coli* بواسطة الإبرة ذات العقدة.

٣- يتم صب نصف كمية الوسط المغذي الملقح في طبق بتري معقم، ثم يعاد الوسط (الأنبوب) إلى الحمام المائي عند (٥٠مْ) و يُترك الطبق حتى يتصلب الوسط المغذي.

- يتم تعقيم الأقراص المعدنية السابقة بالطريقة التالية:

- تغسل أولاً بالماء والصابون وتشطف بالماء جيداً.

- وبواسطة ملقط معقم يتم غمس الأقراص في مزيج الكحول الحامضي، ثم تشطف بالماء المعقم.

٤- تُنقل الأقراص المعدنية إلى طبق بتري السابق، وتوضع متباعدة عن بعضها.

٥- يُصبّ ما تبقى من الوسط المغذي المسال فوق الأقراص المعدنية، ويُترك الوسط حتى يتصلب.

٦- يُحضّن الطبق مدة ٤٨ ساعة عند درجة الحرارة ٣٧م.

وبعد التحضين يتم مقارنة المناطق الخالية من النمو البكتيري، المحيطة بكل قرص معدني على حدة، وتُسجّل النتائج كما في الجدول :

المعدن	قطر المنطقة الخالية من النمو البكتيري مقدرة بالملم بالنسبة لبكتريا ***E.coli***
نحاس	
فضة	
ألمنيوم	

ب- التأثير المميت للأشعة فوق البنفسجية:

معظم أنواع البكتيريا تتأذى من الأشعة فوق البنفسجية، باستثناء البكتريا التي تقوم بعملية التركيب الضوئي Photosynthetic bacteria، و التي تحوي صبغات التمثيل الضوئي التي يتطلب عملها التعرض لأشعة الشمس، لتصنيع المواد التي تَحتاجها في عملياتها الحيوية. وبالرغم من أن أشعة الشمس تحوي موجات مختلفة من الضوء (قصيرة، طويلة) إلا أن موجات الأشعة فوق البنفسجية، قصيرة الموجة غير المرئية، هي الوحيدة التي تضر بالبكتريا التي لا تقوم بعملية التمثيل الضوئي Nonphotosynthetic bacteria

المواد و الأدوات اللازمة:

أطباق بتري تحوي وسط الاجار المغذي؛ مصباح يصدر الأشعة فوق البنفسجية؛ بطاقات كرتونية غير نفوذة للضوء بأبعاد ٣×٥ سم؛ مزارع مرق مغذي تحوي بكتريا متبوغة مثل النوع ***Bacillus megaterium*** بعمر ٧٢ ساعة وأخرى تحوي بكتريا غير متبوعة مثل النوع ***Staphylococcus aureus***.

طريقة العمل:

١- لقّح ثمانية أطباق بتري تحوي وسط الآجار المغذي بالنوع الأول من البكتريا، وثمانية أطباق أخرى بالنوع الثاني من البكتريا.

٢- دوّن على السطح السفلي للطبق اسم البكتريا ومدة التعرض للأشعة، حيث سيتم تعريض البكتريا المتبوغة لفترات زمنية على التوالي (١، ٢، ٤، ٨، ١٥، ٣٠، ٦٠) دقيقة في حين يتم تعريض البكتريا غير المتبوغة للإشعاع مدة (١٠، ٢٠ ، ٤٠ ، ٨٠) ثانية و (٢,٥ ، ٥ ، ١٠ ، ٢٠) دقيقة

٣- ضع الأطباق تحت المصباح الذي يصدر الأشعة فوق البنفسجية وذلك بعد نزع أغطيتها الزجاجية وتغطية نصف كل طبق بواسطة بطاقة كرتونية ٣×٥ سم.

٤- بعد انقضاء فترة التعرض للأشعة وفق ما هو مدون أسفل كل طبق، تُعاد الأغطية للأطباق، ويتم تحضينها عند درجة الحرارة ٣٧م مدة ٤٨ ساعة

٥- بعد انقضاء فترة التحضين، لاحظ مناطق نمو البكتريا في الأطباق، وسجل النتائج في جدول يشير إلى شدة النمو مقارنة بفترة التعرض لكل نوع من النوعين البكتيرين المستخدمين على حدة

ملاحظة: يجب تجنب النظر مباشرة إلى الأشعة فوق البنفسجية، لأنها تؤذي العيون.

جـ- تأثير الكحول في البكتريا الملوثة للجلد:

يُستخدم الكحول بتركيز ٧٠% في تطهير الجلد على نطاق واسع، وذلك بمسح الجلد بقطعة قطن مبللة بالكحول. والسؤال المطروح هنا – ماهو تأثير الكحول؟ وهل يقتل الكحول كل أو معظم البكتريا الملوثة للجلد؟ يمكن الإجابة عن هذه التساؤلات بإجراء تجربة بسيطة نستخدم فيها طبق بتري يحوي وسط الآجار المغذي، ثم نطبق عليه ٤ بصمات بإبهامي اليدين.

المواد و الأدوات اللازمة :

طبق بتري يحوي وسط الاجار المغذي عدد (١)؛ بيشر صغير؛ كحول ٧٠% ؛ قطن طبي.

طريقة العمل :

١- (تجرى هذه التجربة بدون غسل اليدين)

٢- بواسطة قلم يتم عمل قطرين متعامدين على السطح السفلي للطبق يقسمه إلى أربعة أرباع متساوية.

ويتم ترميز الربعين اليساريين بـ A,B والربعين اليمينين بـ D,C.

٣- اضغط إبهامك الأيسر على سطح الآجار في الربع A

٤- وبدون أن تلمس أي شيء اضغط إبهامك الأيسر على الاجار في الربع B

٥- اضغط إبهامك الأيمن في الربع C

٦- عقم إبهامك الأيمن بإحدى الطريقتين :

- اغمس الإبهام في بيشر يحوي كحول ٧٠% مدة ٥ ثوان.
- أو امسح الإبهام بواسطة قطن طبي مغموس في كحول ٧٠% .

٧- دع الكحول يجف (يتبخر) تماما عن الجلد.

٨- اضغط إبهامك المعقم فوق سطح الاجار في الربع D.

٩- حضّن الطبق عند ٣٧مْ مدة (٢٤- ٤٨) ساعة.

إن عدد المستعمرات البكتيرية النامية في كل ربع بعد التحضين، ستدل على أهمية استخدام الكحول في تطهير الجلد.

ء- تقييم فاعلية المطهرات بطريقة أقراص ورق الترشيح:

تعتبر هذه الطريقة من أبسط طرق تقييم فاعلية المطهرات على الأنواع البكتيرية. وتعتمد على غمس أقراص ورق الترشيح (0.5 سم) بالمعقم المختبر، ثم وضعها في طبق بتري ملقحاً بالبكتريا المراد اختبار فعل المطهر عليها، ثم تحضين الأطباق للسماح للبكتريا بالنمو، ثم قياس قطر المنطقة الخالية من النمو المحيطة بقرص ورق الترشيح والتي يطلق عليها اسم منطقة الإعاقة Zone of inhibition.

سوف نختبر في هذه التجربة فاعلية ثلاث مطهرات على نوعين من البكتريا.

المواد و الأدوات اللازمة :

أنابيب تحوي وسط الآجار المغذي عدد (٦)؛ أطباق بتري معقمة عدد (٦)؛ مزرعة سائلة لبكتريا *Staphylococcus aureus* موجبة لغرام؛ مزرعة سائلة لبكتريا *Pseuedomonas aeruginosa* سالبة لغرام؛

طبق بتري يحوي أقراص ترشيح معقمة بقطر ٠,٥ سم؛ ملاقط، حمام مائي؛ ثلاثة بياشير تحوي كميات قليلة من المواد التالية: فينول ٥% ، فورم الديهيد ٥% ، محلول يود مائي ٥%.

طريقة العمل :

١- قم بإسالة وسط الآجار المغذي الموجود في الأنابيب، واحتفظ بها سائلة في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٠ م.

٢- اختر رمز P,S لكل نوع من البكتريا المختبرة سابقة الذكر، ورمز 3,2,1 على التوالي للمواد المطهرة (فينول، فورم الديهيد، يود مائي)

٣- اكتب على السطح السفلي للطبق رمز البكتريا والمادة المطهرة المستخدمة حيث ترمز الأطباق الستة بالرموز $P_1, P_2 , P_3 , S_1 , S_2 , S_3$.

٤- لقّح الوسط المغذي بالبكتريا المختبرة، وذلك بواسطة إبرة تلقيح ذات عقدة، ثم صب محتويات كل أنبوب في طبق بتري المناسب، واترك الأطباق حتى يتصلب الوسط المغذي فيها.

٥- اغمس طرف قرص ورقة الترشيح في محلول المادة المطهرة حتى يتشرب كامل القرص بها، ثم انقله إلى وسط طبق بتري ملقح بالبكتريا المختبرة (يتم حمل القرص باستخدام ملقط معقم).

٦- حضّن الأطباق مدة ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ م.

وبعد التحضين : يتم قياس قطر منطقة الإعاقة (الخالية من النمو البكتيري) المحيطة بقرص ورقة الترشيح باستخدام مسطرة مدرجة، ويتم القياس من حافة قرص ورق الترشيح إلى حافة بداية النمو البكتيري، ثم دوّن النتائج في جدول لمقارنة فاعلية المطهرات على النوعين البكتيريين كما يلي:

المادة المطهرة	قطر منطقة الإعاقة مقدرة بالملم	
	Staphylococcus aureus	*Pseudomonas aeruginosa*

فينول ٥%		
فورم الديهيد ٥%		
يود مائي ٥%		

التضاد الحيوي بين الأحياء الدقيقة Microbial Antagonism

يقصد بالتضاد الحيوي وجود كائنين معاً يعمل أحدهما على إحداث ضرر واضح بالكائن الآخر نتيجة لإفرازه مادة كيماوية يطلق عليها اسم المضاد الحيوي Antibiotic.

تعمل هذه المواد التي تفرزها الكائنات التضادية Antagonist على قتل أو إبطاء نمو كائن حي واحد أو أكثر، وهي بذلك قد تكون متخصصة أو غير متخصصة.

سندرس في هذا الاختبار القدرة التضادية لدى ثلاثة أنواع من الكائنات الحية الدقيقة وهي

Penicillium notatum, Pseudomonas fluorescens, Bacillus cereus var mycoides

و دراسة تأثيرها على نوعين من البكتريا:

Escherichia coli (سالبة لغرام)

Staphylococcus aureus (موجبة لغرام)

المواد والأدوات اللازمة:

أنابيب اختبار تحوي وسط الاجار المغذي عدد (٦)؛ أطباق بتري معقمة عدد (٦)؛ مزارع سائلة لكل من الأنواع: *B.cereus, S.aureus, E.coli, P.fluorescens*؛ مزرعة نقية للفطر *Penicillium notatum* بعمر ٨-١٢ يوم.

طريقة العمل:

١- قُم بإسالة الوسط المغذي، واحتفظ به سائلاً في حمام مائي عند درجة حرارة ٥٠م.

٢- اكتب على كل طبق من الأطباق المعقمة اسم لكائن المختبر والكائن التضادي بحيث يتم اختبار القدرة التضادية لكل الكائنات على كل كائن مختبر في طبق مستقل كما يلي:

رقم الطبق	Testorganism الكائن المختبر	Antagonist الكائن التضادي
I	*S.aureus*	*B.cercus var mycoides*
II	=	*P.fluorescens*
III	=	*Penicillium notatum*
IV	*E.coli*	*B.cereus var mycoides*
V	=	*P.fluorescens*
VI	=	*Penicillium notatum*

٣- اكتب على ثلاثة من أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط المغذي المسال اسم بكتريا *S.aureus* والأنابيب الثلاثة الباقية اسم *E.coli*

٤- لَقّح كل أنبوب من الأنابيب السابقة بالنوع البكتيري المناسب (المكتوب عليه) باستخدام الإبرة ذات العقدة حيث يتم نقل عقدة ممتلئة من المزرعة السائلة إلى الوسط المغذي، ثم لهّب فوهات الأنابيب، وصبّ محتويات كل أنبوب في الطبق المخصص.

٥- انتظر حتى يتصلب الوسط في الأطباق ثم خطط كل طبق بأحد الكائنات التضادية المناسبة (وفق ماهو مكتوب عليها)

٦- حضّن الأطباق مدة ٢٤ ساعة عند الدرجة ٣٧ م.

بعد انقضاء التحضين افحص الأطباق بعناية ودقة باحثاً عن مناطق التثبيط (الخالية من النمو) حول خطوط زراعة البكتريا المختبرة، ودوّن نتائجك في جدول.

اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بطريقة أقراص كيربي – باور

Antimicrobic Sensitivit Testing : the Kirby – Bauer method

المواد والأدوات اللازمة:

أقراص من ورق الترشيح بقطر ٧ ملم؛ مزارع سائلة نقية لثلاثة أنواع من البكتريا هي: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis* ؛ محاليل لثلاثة أنواع من المضادات الحيوية بتركيز ٢٠٠ ميكروغرام وهي: بنسلين Penicillin و سترتبومايسين Streptomycin اكسي تتراسلين Oxtetracycline ؛ أطباق بتري معقمة عدد (٣) ؛ أنابيب اختبار تحوي وسط الآجار المغذي عدد (٣)؛ ماصات معقمة سعة ١ مل عدد (٣)؛ ماصات دقيقة معقمة سعة 0.1 مل عدد (٣).

طريقة العمل :

١- قم بإسالة الوسط المغذي واحتفظ به سائلاً في حمام مائي درجة حرارته ٥٠ م.

٢- دوّن على السطح السفلي للطبق اسم البكتريا المختبرة بعد تقسيم الطبق إلى ثلاثة مناطق متساوية بواسطة قلم يكتب على الزجاج وفي كل قسم يدوّن اسم أحد أنواع المضادات الحيوية المستخدمة في الاختبار.

٣- لقح أحد الأنابيب الحاوية على وسط الاجار المغذي بإضافة ٠,١ مل من مزرعة حديثة من بكتريا *E.coli* والأنبوبة الثانية بإضافة ٠,١ مل من مزرعة حديثة لبكتريا *B.subtilis* والأنبوبة الثالثة بمزرعة بكتريا *S.aureus*.

٤- صب محتويات الأنابيب في أطباق بتري المناسبة واتركها حتى تتصلب.

٥- أضف ٠,١ مل من محلول المضاد الحيوي إلى ثلاثة أقراص ورق ترشيح واتركها لتجف قليلا ثم بواسطة ملقط معقم ضع كل قرص في المكان المخصص له في الأطباق الثلاثة مع الضغط البسيط على القرص حتى يلتصق بسطح الوسط المغذي

٦- كرر العملية السابقة لبقية المضادات الحيوية بحيث يحوي كل طبق ثلاثة أقراص مشبعة بثلاثة أنواع من المضادات الحيوية (أصبح كل قرص يحوي ١٠ مكروغرام)

٧- حضّن الأطباق مدة ٤٨ ساعة عند درجة حرارة ٣٠ م على أن تُراقب الأطباق بعد ١٦-١٨ ساعة من التحضين

٨- بعد انقضاء فترة التحضين يتم قياس قطر المنطقة الخالية من النمو بواسطة مسطرة، وتحسب المسافة من حافة ورق الترشيح وحتى بداية النمو البكتيري وتقدر بالملم . دوّن نتائجك في جدول.

الفصـــل العـاشـــر
الوجيز في ميكروبيولوجيا التربة

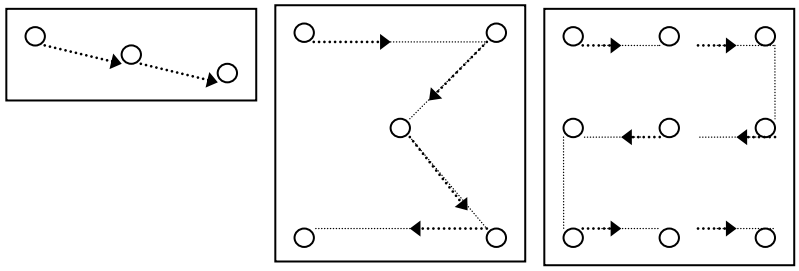
يُنْظَر إلى التربة من وجهة نظر العاملين في مجال الأحياء الدقيقة ، على أنها ذاك الوسط الذي يَعِجُّ بمجموعات كثيرة من البكتريا و الأكتينومايسيتس و الفطريات و الطحالب ووحيدات الخلية (البروتوزوا) وغيرها من الأحياء. و التربة واحدة من أكثر الأماكن في الطبيعة ديناميكية في العلاقات المتبادلة بين الكائنات الحية، كما أنها المنطقة التي يتم فيها الكثير من العمليات الكيميائية الحيوية المتعلقة بتحليل المادة العضوية وتحوية الصخور وتغذية المحاصيل الزراعية.

سيتم في هذا الفصل استعراض بعض المجموعات المختلفة من الكائنات الحية الدقيقة في التربة وبعض العمليات البيوكيميائية (الحيوية) التي تقوم بها هذه الكائنات.

أولاً – دراسة المجاميع الأساسية للأحياء الدقيقة في التربة
(البكتريا – الأكتينومايسيتس- الفطريات - الطحالب)

١– أخذ عينة التربة وطريقة تحضيرها :

تؤخذ عينة التربة بواسطة أدوات (مسبر، معول صغير، سكين) معقمة مسبقاً بالكحول والتلهيب،حيث تُؤخذ (٣) عينات بوزن (٠.٥)كغ من مناطق مختلفة في حال كانت المساحة المراد دراستها (١٠٠)م^{٢}، و(٥) عينات إذا كانت المساحة أكثر من (١٠٠) م^{٢}. وتؤخذ (١٥) عينة في حال كانت المساحة هكتاراً (انظر الشكل–٥٧) .



(الشكل– ٥٧) طريقة أخذ عينات التربة

وبديهي أنه كلما ازداد عدد العينات، كان ذلك أفضل. تُخلط العينات المأخوذة

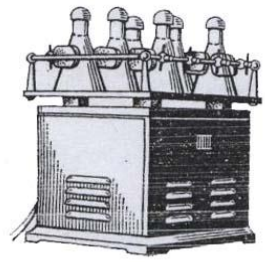
بشكل جيد ليتم الحصول على عينة مركبة بوزن كغ واحد. وتُسْتَبعد من العينة بواسطة ملقط معقم جذور النباتات وغيرها من المواد والأشياء الغريبة عن التربة.

توضع العينات إما في عبوات زجاجية معقمة ذات غطاء قطني ، أو في أكياس ورقية ، أو بلاستيكية معقمة . ويُكتب على اللصاقة التي يجب أن تكون موجودة على كل عينة ، بعض المعلومات الضرورية مثل : مكان أخذ العينة ، العمق، نوع التربة ، النباتات المزروعة ، العمليات الزراعية التي خضعت لها التربة من ري وتسميد وحراثة وغيرها من المعلومات الأخرى.

تُجرى عملية تحليل العينات في نفس اليوم الذي أُخذت فيه . وفي حال تعذر ذلك يمكن حفظ العينات عند الضرورة في البراد لمدة يومين عند (٥–٦) مْ. ويجب الانتباه إلى ضرورة عدم حفظ العينات الموضوعة في الأكياس البلاستيكية لمدة طويلة ، حتى لا يتكون بداخلها نظام غازي خاص يمكن أن يؤثر على الكائنات الدقيقة وبالتالي على نتائج التحليل.

٢– تحضير معلّق التربة :

تؤخذ بواسطة ملعقة معقمة بالكحول والتلهيب ، كمية من التربة وتوضع في زجاجة ساعة معقمة مسبقاً. ويوزن منها (١٠) غ، تُغطّى عينة التربة الموزونة بزجاجة ساعة أخرى معقمة وذلك لدرء تلوثها بمكروبات الهواء . ينُقل (١٠)غ إلى حوجلة سعة (٢٥٠) مل تحوي على (٩٠) مل ماء معقم. ترج الحوجلات لمدة (١٠) دقائق على رجّاج كهربائي (الشكل–٥٨)



(الشكل – ٥٨) الرجاج الكهربائي

تنويه هام :

وجد بعض الباحثين أن الطريقة السابقة لتحضير عينة التربة غير كافية لإظهار جميع الكائنات الدقيقة الموجودة في العينة . واقتُرح معاملة عينة التربة بالطريقة التالية :

١- توضع العينة في طبق معقم أو هاون خزفي معقم ويُضاف (٠.٤ – ٠.٨) مل ماء أو ١% من محلول $Na_4P_2O_4$ لكل (١) غ تربة .

٢- تُدعَّك عينة التربة لمدة (٥) دقائق بواساطة مدقّة مطاطية معقمة ، أو بواسطة الإصبع الملَبَّس بقفّاز مطاطي معقم، ويستمر دعك العينة حتى يصبح قوام التربة عجينيّاً .

٣- تُجهز لكل عينة تربة حوجلتان معقمتان بسعة (٢٥٠) مل، الأولى تحتوي على (١٠٠) مل ماء معقماً والثانية فارغة .

٤- يتم نقل عينة التربة من طبق بتري أو من الهاون إلى الحوجلة الفارغة بواسطة الغسيل المتكرر بالماء الموجود في الحوجلة الأولى .وينبغي أن تتم هذه العملية في ظروف معقمة (قرب مصباح اللهب أو في غرفة العزل) .

٥- ترج الحوجلات المحتوية على التربة لمدة (٥) دقائق بالرجّاج الكهربائي وتترك لمدة (١٠) دقائق ويجهز مباشرة التخفيفات المتتالية .

تجهيز التخفيفات المتتالية :

يُفَضَّل إجراء التخفيفات المتتالية في حوجلات سعة (٢٥٠) مل ، تحوي كل منها (٩٠) مل ماء معقماً ، حيث يؤخذ من كل تخفيف بواسطة ماصة معقمة (١٠) مل، ليوضع في الحوجلة التالية .وعند الانتقال من تخفييف إلى آخر يجب حتماً استخدام ماصة معقمة جديدة.يتم تجهيز التخفييفات 10^{-2} ,10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} .... وينبغي مباشرة كتابة مستوى التخفيف على الحوجلات . تُجري عملية الزرع من التخفيفات على الأوساط المغذية الصلبة والسائلة ، ويتوقف عدد الأوساط المغذية المستخدمة ونوعها على الأهداف المتوخاة من الدراسة .

كما يمكن إجراء التخفيفات المتتالية في أنابيب اختبار ، عند ذلك يجب أن يحوي كل أنبوب اختبار على (٩) مل ماء معقم. حيث يؤخذ من كل تخفيف بواسطة ماصة معقمة (١) مل ليوضع في أنبوب اختبار آخر وهكذا. ويجب استخدام ماصة معقمة جديدة

عند الانتقال من تخفيف إلى آخر ، ولا ننسى أن نكتب مباشرة على الأنابيب مستوى التخفيف .

٣- إجراء عملية الزرع :

يجرى الزرع إما سطحياً أو عميقاً :

أ – **الزرع السطحي** : ويتم على النحو التالي :

١- توزّع الأوساط المغذية المحتوية على الآجار والمذابة والمبردة إلى (٤٥–٥٠) مْ، في أطباق بتري معقمة بواقع (١٥–٢٠) مل في كل طبق .

٢- يُنقل بواسطة ممص مدرج ومعقم ، إلى كل طبق (٠.٠٥) مل من التخفيف الموافق (أو أي كمية أخرى محسوبة بدقة) .

٣- بواسطة ماسحة زجاجية (ناشر) معقمة ، يتم توزيع (٠.٠٥) مل على كامل سطح الطبق . ويستمر المسح على سطح الوسط حتى تجف العينة المأخوذة. ويُستخدم عادة (٣–٥) طبق لكل تخفيف .

٤- تُحضَّن الأطباق المزروعة مقلوبة، عند درجة حرارة تتناسب والخواص الفيزيوبيوكيميائية للكائنات الحية الدقيقة المراد دراستها. ويتوقف اختيار مستوى التخفيف المناسب، على كمية الكائنات الدقيقة المتوقع وجودها في العينة الابتدائية، وهذا بدوره يتوقف على عوامل عدة منها : عمق التربة ، وخصوبة التربة، وفصل السنة ، ونوع المحصول ، والعمليات الزراعية المطَبَّقة . مع العلم أنه عند اختيار التخفيف المناسب يمكن الاعتماد على نتائج تجارب سابقة مشابهة (عند نفس الظروف). وفي حال عدم وجود مثل هذه التجارب يُصار إلى إجراء عملية الزرع التجريبي ، حيث يتم الزرع من كل التخفيفات المعمولة. وبعد عملية التحضين سيبدو أي التخفيفات هي الأنسب لإجراء عملية الزرع اللاحق أو الحالي. حيث يُؤخذ بعين الاعتبار الأطباق التي تحتوي عدداً من المستعمرات لا يقل عن (٣٠) ولا يزيد عن (٣٠٠) مستعمرة .

ب – الزرع العميق :

ويتم على النحو التالي :

١- يؤخذ (١) مل (أو أي كمية معروفة بدقة) من التخفيف المناسب ليوضع في طبق بتري.

٢- يُذاب الوسط المغذي الآجاري المستخدم ، ويُترك حتى تنخفض درجة حرارته إلى (٤٥-٥٠) م .

٣- يُوزّع الوسط المغذي في أطباق بتري المحتوية على العينة ، وتُمزج محتويات العينة مع الوسط عن طريق تحريك الطبق على سطحٍ مستوٍ حركة رحوية لطيفة .ثم تحضّن الأطباق مقلوبة عند درجة حرارة مناسبة .

٤- حساب عدد الكائنات الحية الدقيقة في ١ غ تربة جافة تماماً :

بعد التحضين تظهر المستعمرات التي ترى بالعين المجردة أو بواسطة جهاز عدّ المستعمرات.

يجري عدّ المستعمرات التابعة لكل تخفيف على حده . ويحُسب متوسط عدد المستعمرات التابعة لكل تخفيف، ويُضرب بمقلوب التخفيف، وكذلك بالرقم (٢٠) [وذلك للحصول على عدد الخلايا في ١ مل لأن ٠.٠٠٥ × ٢٠ = ١ مل]، هذا في حال الزرع السطحي وعند أخذ (٠.٠٠٥) مل من التخفيف المناسب .

ملاحظة :

في أثناء أخذ عينة التربة للتحليل الميكروبيولوجي، يُؤخذ في ذات الوقت ومن نفس التربة كمية منها لتقدير رطوبتها وذلك لحساب تعداد المجموعة من الكائنات الدقيقة المدروسة الموجودة في (١) غ تربة جافة جفافاً تاماً (عند ١٠٥ْ م حتى ثبات الوزن) .

عند الزرع في أوساط مغذية سائلة، توزّع الأخيرة في حوجلات زجاجية بواقع (٢٠) مل في كل حوجلة أو في أنابيب اختبار (وهذا مايتم على الأغلب) بواقع (١٠) مل في كل أنبوب، ثم تُعَقَّم الأنابيب وتتم عملية الزرع بأن يؤخذ من كل تخفيف (١) مل ليوضع في الوسط المغذي السائل.ويجري الزرع من كل تخفيف في (3-5) أنابيب اختبار (مكررات).

البكتريـــا

لا يمكن تحديد كل أنواع البكتريا الموجودة في التربة من خلال تنميتها على بيئة غذائية واحدة لأنه لا يوجد وسط مغذٍ واحد يكفل نمو جميع أنواع الكائنات الدقيقة الموجودة في التربة، لذا سنكتفي هنا بدراسة البكتريا المستخدمة لأشكال الآزوت العضوي، أو ما يسمى ببكتريا النشدرة .

المواد والأدوات اللازمة:

عينة التربة المدروسة؛ مجفف؛ وسط الآجار المغذي؛ حمام مائي، أنابيب اختبار تحوي ٩ مل ماء معقم؛ أطباق بتري معقمة؛ ماصات معقمة؛ ماسحات معقمة؛ حاضنة؛ المجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة :

١- تُؤخذ عينة التربة وتُحضَّر بالطريقة المشروحة آنفاً، وبنفس الوقت يؤخذ منها كمية معينة ليتم تحديد رطوبتها .

٢- يُجهز وسط الآجار المغذي ويوزّع على أطباق بتري معقمة [يتم إسالة الوسط في حمام مائي عند (١٠٠) مْ إذا كان صلباً، ويُنْتظَر حتى تنخفض درجة حرارته إلى (٤٥-٥٠) مْ].

٣- تُجهز التخفيفات المتتالية 10^{-2}، 10^{-3} ،10^{-4} ،10^{-5}. ويجب ألا يغيب عن البال ضرورة استخدام ماصة معقمة جديدة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر.

٤- يُؤخذ (٠.٠٥) مل بواسطة ماصة معقمة من التخفيفات 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-5}. لتزرع في أطباق بتري، بحيث يُخَصّص لكل تخفيف من (٣-٥) أطباق معقمة. ويجب استبدال الماصة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر .

٥- بواسطة الماسحة الزجاجية المعقمة (الناشر)، يتم توزيع العينة على كامل مساحة سطح أطباق بتري (الزرع سطحي). ويجب استبدال الماسحة الزجاجية عند الانتقال إلى أطباق بتري تحوي عينات مأخوذة من تخفيف آخر . أي ينبغي استخدام ماسحة واحدة لكل تخفيف .

٦- يكتب على الأطباق جميع المعلومات الضرورية: مستوى التخفيف 10^{-3} ،10^{-4} ...،

مكان أخذ العينة ، تاريخ إجراء الزرع ، الوسط المغذي المستخدم ، عمق التربة وغيرها من المعلومات ... .

٧- توضع الأطباق مقلوبة في الحاضنة عند (٢٨-٣٠) ْم لمدة (٥-٧) أيام .

النتائج :

- تُعّد المستعمرات النامية على الوسط المغذي بقلم حبر أسود وذلك منعاً لتكرار عدّها ثانية، ويحسب من ثمَّ عدد المستعمرات التابعة لكل تخفيف .
- يؤخذ بعين الاعتبار أطباق بتري المحتوية على أعداد من المستعمرات تتراوح بين (٣٠-٣٠٠) مستعمرة .
- يجري حساب تعداد البكتريا في (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً، وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات النامية التابعة لتخفيف ما، بمقلوب نفس التخفيف، ثم بالرقم (٢٠) (وذلك للحصول على عدد الخلايا في ١ مل) وتُقْسم النتيجة على وزن (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً وذلك بعد معرفة رطوبة التربة.

مثال :

تبيّن عند إجراء الزرع السطحي، بأخذ (٠.٠٥) مل من معلق التربة التابع للتخفيف 10^{-3} . أن متوسط عدد المستعمرات في (٥) أطباق بتري عبارة عن (٥٢). وكانت رطوبة التربة المدروسة مساوية ٢٥% أحسب عدد الخلايا الموجودة في (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً.

$$\text{عدد الخلايا في (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً} = \frac{٥٢ \times ٢٠ \times ١٠٠٠}{٠.٧٥} = ١.٣٨٦٦٦$$

ملاحظة :

عند إجراء الزرع العميق لايتم ضرب متوسط عدد المستعمرات التابعة لتخفيف ما بالرقم (٢٠) لأنه عند إجراء الزرع العميق يتم عادة استخدام (١) مل من معلق التربة.

- يتم إجراء توصيف للمستعمرات النامية وكذلك إجراء الدراسة المجهرية (أي دراسة الخواص المزرعية والمجهرية) . راجع الفصل التاسع.
- يمكن عزل بعض المستعمرات ليتسنى دراستها لاحقاً. وتحديد الخواص الفيزيولوجية والبيوكيميائية .

على العموم تنمو الأجناس التالية وغيرها على وسط الآجار المغذي :

Pseudomonas, Flavobacterium, Bacillus ,Sarcina, Mycobacterum , Actinomyces.

الأكتينومايسيتس **Actinomycetes**

تتبع الأكتينومايسيتس إلى البكتريا وتدرس بشكل مستقل ليس على اساس تقسيمي (تصنيفي) وإنما لسعة انتشارها في التربة ولأهميتها في إحداث بعض التحولات البيوكيميائية فيها.

يتم دراسة الأكتينومايسيتس في التربة على النحو التالي:

١- يحضّر الوسط المغذي التالي (غ/ ليتر ماء مقطر): نشاء ذوّاب-١٠، $(NH_4)SO_4$-٢، K_2HpO_4-١، $MgSO_4.7H_2$ -١، NaCl -١، $CaCO_3$ -٣ ، آجار -٢٠. ثم يتم صب الوسط في أطباق بتري.

٢- تحضّر التخفيفات المتتالية كالمعتاد : 10^{-2} ، 10^{-3} 10^{-4}، 10^{-5}، ولا ننسى استبدال الماصة المعقمة بأخرى معقمة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر. كما لاننسى أن نكتب مباشرة أرقام التخفيفات على الأنابيب أو الحوجلات المستخدمة.

٣- يؤخذ (٠.٠٥) ملم من التخفيفات 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5} لتوضع على أطباق بتري بحيث يخصص لكل تخفيف (٣-٥) أطباق معقمة .

٤- توزّع العينة المأخوذة على كامل سطح الأطباق بواسطة ماسحات زجاجية ، حيث يستعمل ماسحة واحدة لكل تخفيف .

٥- توضع الأطباق مقلوبة في الحاضنة عند (٢٨-٣٠)مْ لمدة (٧-١٠) أيام .

النتائج :

- يمكن أن ينمو على الوسط المغذي المستخدم بالإضافة إلى الأكتينومايسيتس بكتريا أخرى مستخدمة لأشكال الآزوت المعدني. لاحظ ذلك.
- لاحظ الفرق بين المستعمرات البكتيرية والفطرية ومستعمرات الأكتينومايسيتس.
- لاحظ خصوصيّة مستعمرات الأكتينومايسيتس. حيث أن قسماً من المستعمرة يكون غائراً (منغمساً) في الوسط المغذي والقسم الآخر فوق الوسط المغذي (راجع الفصل الخامس).
- قم بتوصيف المستعمرات (الخواص المزرعيّة) ومشاهدة بعض منها تحت المجهر (الخواص المجهرية) .
- يتم حساب عدد الأكتينومايسيتس في (١)غ تربة جافة جفافاً مطلقاً، بنفس الطريقة المتبعة عند تقدير أعداد البكتريا، وذلك بعد معرفة نسبة الرطوبة للتربة المدروسة.

الفطريات المجهرية

لدراسة فطريات التربة، وعزلها يتم اتباع ما يلي :

المواد والأدوات اللازمة:

عينة التربة المدروسة؛ وسط مستخلص المولت؛ وسط تشابك؛ أطباق بتري معقمة؛ ممصات سعة ١مل معقمة؛ أنابيب اختبار تحوي ٩ مل ماء معقم؛ حمض اللبن أو حمض الليمون، المجهر ومستلزمات الفحص المجهري.

الطريقة :

١- تؤخذ عينة التربة بالطريقة المشروحة آنفاً، وبنفس الوقت تؤخذ كمية معينة منها لتحديد رطوبتها .

٢- يمكن استخدام الوسطين المغذيين التاليين :

آ- وسط آجار مستخلص المولت Malt المكون من غ/ليترماء مقطر :

(٣٠)غ مستخلص المولت، (٢٠)غ آجار، يُعقم الوسط بالصاد الموصد عند

(١١٥)مْ لمدة (٣٠)دقيقة .

ب- وسط تشابك Czapek's medium المكوّن من غ/ليتر ماء مقطر :

سكروز أو غلوكوز -٢٠، $NaNO_3$ -٢، K_2HPO_4 -١، $MgSO_4.7H_2O$ - ٠.٥ ، KCl - ٠.٥ ، $CaCO_3$ -٣ ،آجار -٢٠ .

يُعقم الوسط بالصاد الموصد عند (١١٥)مْ لمدة (٣٠) دقيقة .

باعتبار أن الفطريات متحملة للحموضة ، ولتثبيط نمو البكتريا، يتم تحميض الأوساط المغذية الفطرية ليصبح درجة حموضتها مساوية (pH = 4)، ويُستخدم عادة حمض اللبن المركز بواقع ٢ مل/ليتر. أو حمض الليمون بواقع ٠.٥ غ/ليتر.

٣- تجهّز التخفيفات المتتالية 10^{-2}،10^{-3} كالمعتاد ويؤخذ بواسطة ماصة معقمة (١) مل من التخفيفين 10^{-2}، 10^{-3} (طبعاً كلٍ على حده) لتوضع في أطباق بتري معقمة. ويُخصص لكل تخفيف (٣-٥) أطباق . ثم يُصب الوسط المغذي المستخدم والذي ينبغي ألا تكون درجة حرارته أعلى من ٤٥-٥٠ْم (الزرع العميق) وبحركة رحوية بسيطة يتم تحريك محتويات الأطباق على سطحٍ مستوٍ.

٤- يُكتب على الأطباق المعلومات الضرورية مثل: مستوى التخفيف، الوسط المستخدم، مكان أخذ العينة والتاريخ وغيرها من المعلومات التي يراها الدارس مناسبة وضرورية .

٥- تحضّن الأطباق مقلوبة عند (٢٨-٣٠)مْ لمدة (٥-٧) أيام .

النتائج :

- يتم ملاحظة الفرق بين المستعمرات البكتيرية (التي نمت على وسط الآجار المغذي) والفطرية.
- يتم إجراء توصيف للمستعمرات الفطرية وإجراء الفحص المجهري لها. وتحديد الأنواع الأكثر انتشاراً.
- يتم حساب عدد الفطريات الموجودة في (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات التابعة للتخفيف المدروس (التي أخذت منه العينة)

بمقلوب نفس التخفيف مقسوماً على وزن (١)غ تربة جافة جفافاً تاماً.

الطحالب Algae

الطحالب هي كائنات حية تقوم بعملية التمثيل الضوئي، ذات أحجام تتفاوت بين وحيدة الخلية وعديدة الخلايا، البعض منها مجهري والبعض الآخر ذو تَعَضٍّ واضح شبيهٍ بالنبات . بيد أن أغلب طحالب التربة ذات أحجام مجهرية .

تقوم البكتريا الخضراء المزرقة (التي كانت تتبع سابقاً الطحالب وتتبع حالياً بدائيات النوى *Procaryote*) بتثبيت الآزوت الجوي مثل: الأجناس *Anabaena*, *Nostoc*.

لما كانت الطحالب ذاتية التغذية ضوئياً Photoautotrophes فيجب زراعتها في أوساط مغذية انتخابية لاتحتوي على كربون عضوي ، الأمر الذي يعمل على كبح نمو الكائنات الدقيقة الأخرى. ويمكن أن يكون الوسط أكثر انتخابيةً، عند دراسة البكتريا الخضراء المزرقة وذلك بعدم إضافة أي مصدر آزوتي مثل الأمونيوم والنترات .

الطريقة :

١- يحضّر الوسط المغذي السائل (وسط بريستول) المكوّن من (غ/ليتر ماء مقطر):
0.25- $NaNO_3$، 0.025-KCl، 0.75- $MgSO_4.7H_2O$، 0.018-KH_2PO_4،
0.07- K_2HPO_4، 0.025 -NaCl ، 0.01-$FeCl_3$ ، 0.002-$Na_2MO_2H_2O$

٢- يحضّر الوسط المغذي الثاني (وسط تشو Chu's medium) المكوّن من :
0.01- K_2HpO_4غ، 0.025- $MgSO_4.7H_2O$غ، كربونات الصوديوم-٠.٠٢غ، سيليكات الصوديوم -٠.٠٢٥غ ، سترات الحديد -٣ ملغ، حامض الستريك -٣ملغ، موليبدات الصوديوم المائية -٠.٠٠٢غ ، محلول العناصر الصغرى* - ١ مل.

٣- تُجهَز كالمعتاد التخفيفات المتتالية من ١٠^{-1} إلى ١٠^{-5}.

٤- ينقل بواسطة ماصة معقمة (١) مل من كل تخفيف ليوضع في (٣) أنابيب اختبار تحوي وسط بريستول و (٣) أنابيب تحوي وسط تشو . ويجب ألا ننسى كتابة أرقام

*** يتكون محلول العناصر الصغرى من : كبريتات المنغنيز - ٢.١ غ، حامض البوريك - ٢.٨ غ، نترات النحاس المائية -٠.٠٤ غ، كبريتات الزنك المائية - ٠.٢٤ غ ، ماء مقطر ١٠٠٠ مل**

التخفيفات على الأنابيب ، وأسماء الأوساط المغذية .

٥- توضع الأنابيب المزروعة في مكان تصل إليه اشعة الشمس لمدة (٣٠) يوماً .

النتائج :

- تُفْحَص الأنابيب باستخدام مصدر ضوئي ، ويتم تحري وجود النمو، أو اللون الأخضر.
- يُؤخذ عينات من الأنابيب التي ظهر فيها نموات لإجراء الفحص المجهري.
- يمكن الكشف عن البكتريا الخضراء المزرقة (السيانوباكتريا) عند استخدام الوسط المغذي تشو Chu's medium .

التعرف على الأحياء الدقيقة للتربة بطريقة الشريحة الملامسة The contact slide

تُمَكّن هذه الطريقة من تعرّف الأحياء الدقيقة للتربة في مكان وجودها الطبيعي بدون اللجوء إلى تغيير بناء التربة، أو التأثير في كيفية الوجود الطبيعي للأحياء الدقيقة.كما تُظْهر هذه الطريقة أيضاً العلاقة البيئية المتبادلة بين البكتريا والفطريات والأكتينومايسيتس وأجزاء المادة العضوية وحبيبات التربة ، وحتى جذور النباتات .

المواد والأدوات اللازمة:

عينات التربة المدروسة؛ منخل؛ برسيم مطحون، تبن مطحون، نترات الأمونيوم، بياشر، شرائح زجاجية، حمض الخل 40%، صبغة الروز بنغال الفينولي. المجهر ومستلزمات العمل المجهري.

الطريقة :

١- تُؤخذ (٣) عينات من التربة، كل عينة تزن (٢٠٠)غ تربة منخولة . وتوضع على أوراق موزّعة على الطاولة .

٢- تُترك إحدى العينات دون أية إضافة. بينما يُضاف إلى العينة الثانية (٢)غ من البرسيم المطحون الذي يُخلط جيداً مع عينة التربة. كما يُضاف إلى العينة الثالثة (٢)غ

من التبن المطحون و (٠.١)غ من نترات الامونيوم ويُخلط مع عينة التربة بشكل جيد.

٣- تُنْقَل كل عينة على حده إلى كأس (بيشر) سعة (٢٥٠)مل.

٤- توضع (٢-٤) شرائح زجاجية نظيفة بشكل عمودي في كل كأس بحيث يفصل بين كل شريحة وأخرى مقدار (٢)سم. وبحيث يُتْرَك (٢) سم من الشريحة الزجاجية خارج التربة.

٥- يُضاف إلى كل كأس (بيشر) ومن الاطراف مقدار (١٥) مل من الماء . وذلك لجعل التربة مشبعة بالماء بحوالي (٥٠-٦٠%) من سعتها، ولكن دون إغراق التربة بالماء.

٦- تُغَطَّى الكؤوس (بورق القصدير مثلاً). وتُحَضَّن على درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع.

٧- بعد انتهاء مدة التحضين . تُؤخذ شريحة واحدة من كل كأس، وذلك بضغطها للجانب قليلاً ، ثم تُسْحَب نحو الأعلى .

٨- يتم إزالة حبيبات التربة الكبيرة من الجانب المضغوط (هذا الجانب ستتم عليه الدراسة المجهرية) وتترك الشريحة لتجف في الهواء .

٩- يُضاف إلى الشريحة حمض الخل ٤٠% لمدة (١-٣) دقيقة. ثم يُغسل المحضر بماء الصنبور.

١٠- توضع الشرائح الزجاجية فوق كأس يحتوي ماء يغلي. ويضاف إلى الشرائح صبغة الروزبنغال الفينولي Phenolic Rose Bengal لمدة (٥-١٠) دقيقة (أوكربول الفوكسين).

١١- تُغسل الشريحة بماء الصنبور وتُترك لتجف .

١٢- تفحص الشرائح بالعدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز .

النتيجة:

يمكن ملاحظة خلايا البكتريا وكذلك هيفات الفطريات والأكتينومايسيتس وعلاقة بعضها مع بعض .

تتكون صبغة الروز بنغال الفينولي Phenolic Rose Bengal من: روزبنغال-١غ، كلوريد الكالسيوم -٠.٠٣غ، فينول مائي (٥ %): ١٠٠مل.

ثانياً - دراسة بعض العمليات الحيوية للكائنات الحية الدقيقة في التربة :

النشدرة

Ammonification

نشدرة المركبات البروتينية: كما هو معروف تعتبر البروتينات ذات أوزان جزئية كبيرة، لا تستطيع الدخول إلى الخلايا. بيد أن الأحياء الدقيقة المحللة للبروتين تقوم بإفراز أنزيمات خارجية ، مثل : البروتيئاز Proteases والببتيداز ، التي تفكك الروابط الببتيدية للبروتينات . ونتيجة لذلك تتشكل الببتيدات المتعددة القادرة على الدخول إلى الخلية ، أو أن البروتينات تُحَلْمَه بواسطة أنزيم الببتيداز إلى أحماض أمينية وهذه الأخيرة ، إما أن تُسْتَخدم مباشرة من قبل الخلية أو تتعرض إلى تحلل لاحق حيث يتشكل النشادر والأحماض العضوية وغيرها من المركبات .

يرافق تحلل البروتين في التربة تراكم للنشادر وللأحماض العضوية . ولهذا سميت هذه العملية بالنشدرة .

عند تحلل البروتين ينطلق أيضاً كبريت الهيدروجين والمركبتان والأندول ذوات الروائح الكريهة .

من مسببات عملية النشدرة :

- بكتريا لاهوائية مثل : *Cl.sporogenes . Clostridium putrificus*
- بكتريا هوائية مثل: *Pseudomonas flourescens, Bacillus mycoides*
- بكتريا هوائية اختيارياً مثل : *Escherchia coli, Proteus vulgaris*

التجربة:

المواد والأدوات اللازمة:

وسط المرق المغذي مضافاً إليه ببتون بنسبة ٣%؛ حوجلات سعة ١٠٠ مل؛ ورق عباد الشمس،

خلات الرصاص؛ كاشف بارادايميتيل أميد بنزالدهيد؛ محلول مشبع من كبريتات البوتاسيوم؛ كاشف نيسلر؛ المجهر ومستلزمات الفحص المجهري.

الطريقة:

١- يُجهز وسط المرق المغذي المضاف إليه ببتون بنسبة ٣% .

٢- يُوزّع الوسط المغذي في حوجلات سعة (١٠٠)مل (أرلينات) بواقع (٣٠) مل في كل حوجلة (٤-٥حوجلات). ويُعَقَّم بالصاد الموصد عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠) دقيقة.

٣- يُضاف $\frac{1}{3}$ ملعقة شاي من التربة ثم تُسَدّ الحوجلات بالسدادات القطنية ، على أن يوضع بين السدادة القطنية وجدار فوّهة الحوجلات ورقة عباد شمس حمراء مبلّلة بالماء المقطر وذلك للكشف عن النشادر المنطلق. وكذلك ورقة ترشيح مبلّلة بمحلول قلوي من خلات الرصاص للكشف عن انطلاق غاز كبريت الهيدروجين والمركبتان. وهاتان الورقتان يجب أن تتدليا فوق الوسط المغذي ولكن دون ملامسة سطحه .

٤- بعد (٣-٥) أيام من التحضين عند (٢٨-٣٠) ْم، يتم فحص محتوى الحوجلات وتحديد منتجات تحلل البروتين. و يجري كذلك الكشف عن الأحياء الدقيقة المسببة لعملية النشدرة.

النتائج :

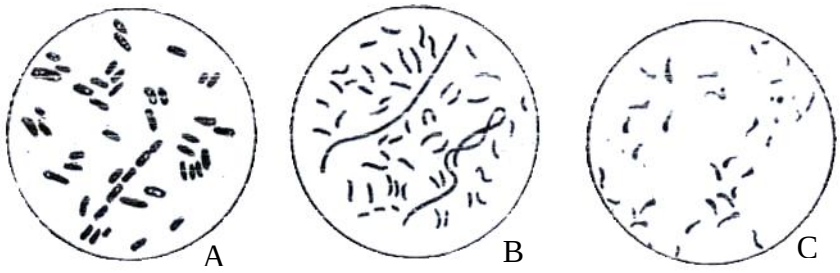
- يتحول لون ورقة عباد الشمس الأحمر إلى اللون الأزرق نتيجة انطلاق NH_3
- يمكن الكشف عن **النشادر** المتكوّن بمساعدة كاشف نيسلر: حيث يوضع على طبق بتري قطرة من الكاشف وقطرة من الوسط، يُلاحظ تكوّن راسب بني عند وجود كميات كبيرة من النشادر . أما عند وجود كميات قليلة من النشادر فيظهر لون برتقالي أصفر .
- يمكن الكشف عن **انطلاق غاز كبريت الهيدروجين** بملاحظة ورقة الترشيح المبلّلة بخلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$. حيث تسوَدّ الورقة تحت تأثيرغاز H_2S. وفي حال غُطِّيت الورقة بلطخ فضيّة اللون، فذلك يعني أنه بالإضافة لوجود غاز H_2S

هناك أيضاً انطلاق للمركبتان.

- يمكن الكشف عن **الأندول** على النحو التالي: يضاف إلى (١٠) مل من باراداي ميتيل أميد بنز الدهيد و (٥) مل من محلول مشبع من كبريتات البوتاسيوم . عند وجود الأندول يظهر اللون الأحمر.

الفحص المجهري : يتم تجهيز محضرات الخلايا الحية وكذلك محضرات الخلايا المثبتة والملوّنة . ويمكن مشاهدة خلايا (الشكل-٥٩) :

- *Proteus vulgaris*: وهي عبارة عن عصيات متحركة، غير متبوّغة، ذوات أطوال متفاوتة .
- *Bacillus mycoides*: بكتريا متبوّغة عصويّة .
- *Clostridium Putrificus*: بكتريا عصوية متبوغة ، أبواغها أعرض من الخلية ذاتها.



A-*Bacillus mycoides* B- *Pruteus vulgaris* C- *Clostridium putrificus*
(الشكل-٥٩) بعض مسببات عملية النشدرة

تحضير الكواشف :

١- **كاشف نيسلر**: يُذاب (٢٠)غ من يوديد البوتاسيوم Kl في (٥٠) مل من الماء، ويضاف إلى المحلول حتى الإشباع حوالي (٣٢)غ يوديد الزئبق HgI_2 و(٤٦٠) مل ماء مقطر و (١٣٤)غ هيدروكسيد البوتاسيوم KOH. يحفظ الكاشف في عبوات زجاجية معتمة .

٢- يحتوي **كاشف باراداي ميتيل أميد بنز الدهيد** على ٤غ باراداي ميتيل أميد بنز الدهيد و (٣٠) مل ٩٦%كحول إيتيلي و (٨٠) مل حمض كلور الماء المركز .

٣- محلول قلوي من **خلات الرصاص**: تُعامَل خلات الرصاص المذابة بمحلول NaOH إلى درجة لا يصبح

الراسب المتكون بعدها ذوّاباً .

النترجة (التأزت)
Nitrification

وهي العملية التي يتم بموجبها تأكسد النشادر إلى نترات ونتريت وتجري على مرحلتين :

المرحلة الأولى : يتم أكسدة الأمونيوم إلى نتريت حسب ما يلي :

$$NH_4^+ + \frac{3}{2}O_2 \longrightarrow NO_2^- + 2H + H_2O$$

وتقوم بهذه المرحلة البكتريا التابعة للجنس *Nitrosomonas* و *Nitrosospira* مثلاً.

المرحلة الثانية : حيث يتم تحويل النتريت إلى نترات :

$$NO_2^- + \frac{1}{2}O_2 \longrightarrow NO_3$$

والمسؤولة عن هذه المرحلة البكتريا التابعة للجنس *Nitrobacter* مثلاً

تستخدم البكتريا الطاقة الناتجة عن أكسدة النشادر والنتريت لتمثيل غاز ثاني أكسيد الكربون . وتحصل بالتالي على الكربون اللازم لتصنيع مادتها الخلوية، و بهذا فإن بكتريا النترجة ذاتية التغذية كيميائياً. وهي هوائية حتماً .

ومنذ زمن قريب، وجد أن لبعض الكائنات الحية الدقيقة غير ذاتية التغذية القدرة أيضاً على إنتاج النتريت والنترات انطلاقاً من مركبات عضوية مختلفة . فعلى سبيل المثال تبيّن أن *Aspergillus flavus* ينتج النترات من المركبات الأمينية.

وهكذا فإن النشادر سواء المتشكل في التربة أو الدبال، وكذلك أملاح الأمونيوم المضافة إلى التربة كسماد، تتأكسد بفعل بكتريا التأزت إلى حمض الآزوتي (نتريت) ومن ثمّ إلى حمض الآزوت (نترات) .

التجربة :

١- يُحَضَّر من أجل المرحلة الأولى لعملية النترجة الوسط المغذي السائل التالي (%).

$(NH_4)SO_4$	- 0,2	NaCl	- 0,2
K_2HPO_4	- 0,1	$FeSO_4.7H_2O$	- 0,04
$MgSO_4.7H_2O$	- 0,05	$MgCO_3$ أو $CaCO_3$	- 0,5

يُحَضَّر من أجل المرحلة الثانية لعملية النترجة الوسط المغذي السائل التالي (%) .

$NaNO_3$	- 0,1	K_2HPO_4	- 0,05
Na_2CO_3	- 0,1	$MgSO_4.7H_2O$	- 0,05
NaCl	- 0,05	$FeSO_4.7H_2O$	- 0,04

٢- بعد مزج مكونات كل وسط بشكل جيد، توزّع الأوساط في حوجلات (أرلينات) سعة (١٠٠) مل بواقع (٣٠) مل في كل حوجلة .

٣- يُضاف إلى كل حوجلة مقدار ربع ملعقة صغيرة من التربة. وتُحَضَّن الحوجلات عند (٢٥-٣٠) ْم لمدة (٧) أيام وأحياناً (١٤ أو ٢١) يوم.

بعد الانتهاء من التحضين يتم دراسة النتائج . حيث يتشكل حمض الآزوتي في الوسط المستخدم لدراسة المرحلة الأولى من عملية النترجة ، ويتشكل حمض الآزوت في الوسط المستخدم لدراسة المرحلة الثانية . ويُسْتَدل على انتهاء التجربة عند اختفاء (انعدام) النشادر بالنسبة للمرحلة الأولى. وانعدام حمض الآزوتي بالنسبة للمرحلة الثانية.

النتائج :

- لدراسة المرحلة الأولى من عملية النترجة يجرى اختبار تشكل حمض الآزوتي وذلك على النحو التالي:

يوضع في أنبوب اختبار (١) مل من كاشف غريس و (١٠) مل من المحلول المدروس ويسخن الأنبوب حتى الغليان. في حال وجود حمض الآزوتي يظهر لون أحمر، حيث يعتبر كاشف غريس حساساً جداً لوجود HNO_2 .

- لدراسة المرحلة الثانية من عملية النترجة يُجرى اختبار تشكل حمض الآزوت على النحو التالي:

يوضع على قطعة بورسلان بيضاء قطرة من H_2SO_4 وقطرة واحدة أيضاً من داي فينيل أمين. يُضاف إليها قطرة من السائل المدروس. في حال احتوى السائل المدروس على حمض الآزوت ستظهر صبغة زرقاء.

تحضير الكواشف:

- **كاشف غريس:** يتألف من محلولين :

١- محلول حمض السلفانيك: يُذاب (0,5) غ من حمض السلفانيك في (٣٠) مل من حمض الخل الجليدي، ثم يضاف (١٠٠) مل ماء مقطر بعد ذلك يتم الترشيح. يعتبر هذا المحلول صالحاً للاستخدام خلال شهر واحد فقط من التحضير.

٢- محلول ألفا نفتيل أمين: يُذاب (0,1) غ من ألفا نفتيل أمين في (١٠٠) مل من الماء المقطر، يتم الغليان، تم يُبرَّد المحلول ويُضاف إليه (٣٠) مل حمض الخل الجليدي. يُرشَّح المحلول ويُحفظ لوقت لا يزيد عن أسبوع .

- **محلول داي فينيل أمين:** يذاب (٥٠) ملغ من مركب داي فينيل أمين Diphenylamine في (٢٥) مل من حمض الكبريت المركز. ويُحفظ في زجاجات بنيَّة بعيداً عن الضوء. يجب أن يُحضَّر المحلول كل (١٤) يوماً.

ملاحظة: يمكن تحديد تعداد بكتريا النترجة باستخدام طريقة العدد الأرجح Most Probable Number (MPN) (راجع الفصل الثامن)

انطلاق الآزوت (عكس التأزت)
Denitrification

تستخدم بعض الكائنات الحية الدقيقة عند التنفس في ظروف لاهوائية أوكسجين النترات ، فتحوّل النترات إلى آزوت جزيئي أو أكسيد الآزوت. سُمِّيَت هذه العملية أيضاً بعكس التأزت. مثل هذا التحوّل للنترات ينبغي النظر إليه كنوع من التنفس . ولهذا سميت عملية عكس التأزت بالتنفس النتراتي*. حيث تستعمل النترات NO_3 بدلاً من الأكسجين كمستقبل للإلكترونات . يمكن أن تتم العملية على النحو التالي :

$$NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$$

نترات نتريت أوكسيد الآزوت نيتروز آزوت جزيئي

وبهذه العملية يمكن أن تفقد التربة الآزوت وخصوصاً في الأراضي ذوات التهوية

*** لبعض البكتريا القدرة على استخدام النترات كمصدر للطاقة ، حيث تحوّله إلى نتريت ثم إلى أمونيا وتدخله في عملياتها الاستقلابية على النحو التالي :**

$$\text{بروتين} \rightarrow \text{أحماض أمينية} \rightarrow NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NH_4OH + NH_3$$

السيئة. تقوم بكتريا انطلاق الآزوت في أثناء عملية التنفس النتراتي بأكسدة الوسط العضوي أكسدة تامة حتى CO_2 و H_2O . وفق ما يلي :

$$C_6H_{12}O_6 + 4NO_3^- \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2N_2 + Q$$

تنتشر بكتريا انطلاق الآزوت على نطاق واسع في الطبيعة. وأغلبها يتبع إلى جنسي *Pseudomonas* و *Micrococcus* وأكثر الأنواع التابعة لهذين الجنسين انتشاراً هي :

Psendomonas stuteri , P.denitrificans , P.fluorescens , Micrococcus dentirificans

التجربة :

١- يحضّر الوسط المغذي المكون من محلولين :

المحلول الأول: KNO_3-٢.١ غ، أسباراجين (١) غ ، ماء مقطر (٢٥٠) مل

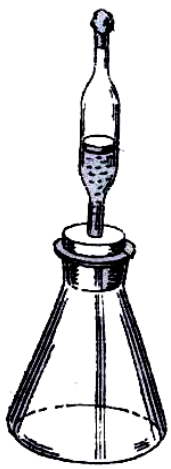
المحلول الثاني: سترات الصوديوم-0,5 غ، KH_2PO_4-٢ غ، $MgSO_4.7H_2O$-٢ غ $CaCl_2$ -٢ غ ، $FeCl_3$ -٠.٠١٤ غ ، ماء مقطر (٥٠٠) مل .

يُمزج المحلولان ويُضبط pH الوسط بحيث يصبح (٦.٨-٧) ثم يكمّل الحجم بالماء المقطر حتى (١٠٠٠) مل .

٢- تُصَب كمية قليلة من الوسط المغذي في حوجلات (أرلينات). ويضاف إليه مقدار $\frac{1}{3}$ ملعقة صغيرة من التربة . وتُخلط التربة جيداً مع الوسط ليتم التخلص من فقاعات الهواء .

٣- تُملأ الحوجلة بالوسط المغذي حتى الفوّهة ، وتُغلَق بسدادة كاوتشوكية مثقوبة من المركز بحيث يخترقها أنبوبة ذات انتفاخ من الوسط (الشكل-٦٠).عند إغلاق الحوجلة بالسدادة سيرتفع الوسط المغذي في الأنبوبة . ويُراعى ألا تتكون فقاعات هواء تحت الأنبوبة.

٤- يُصَب فوق الوسط طبقة رقيقة من زيت الفازلين وذلك



(الشكل-٦٠) جهاز خاص للكشف عن عملية انطلاق الآزوت (عكس التأزت)

لإحداث ظروف لاهوائية. إن انعدام وجود المواد الكربوهيدراتية في الوسط المستخدم سيعمل على منع حدوث عملية تخمر . وستنمو ضمن هذه الظروف فقط تلك الكائنات الدقيقة القادرة على استخدام أوكسجين المركبات المرتبطة وفي المقام الأول أوكسجين النترات .

٥- يتم التأكد من وجود النترات في الوسط المستخدم عند بداية التجربة بواسطة كاشف داي فينيل أمين. حيث يوضع قطرة داي فينيل أمين المذاب في حمض الكبريت على قطعة بورسلان بيضاء ويضاف إليها قطرة من الوسط المغذي المدروس .إن ازرقاق القطرة لهو دليلٌ على وجود النترات في الوسط .

٦- توضع الحوجلات في الحاضنة عند (28-30)ْ م لمدة (5-6) أيام وتجرى الاختبارات. حيث يُسجَّل ظهور فقاعات الغاز CO_2 و N_2 تحت السدادة .

النتائج:

للكشف عن منتجات عملية انطلاق الآزوت (عكس التأزت). تجرى على الوسط المغذي المزروع (الملقح بالتربة) الاختبارات التالية :

١- اختبار الكشف عن النترات NO_3 : باستخدام كاشف داي فينيل أمين .

٢- اختبار الكشف عن النتريت NO_2 : باستخدام كاشف غريس .

٣- اختبار الكشف عن النشادر : بواسطة كاشف نيسلر .

يعطي اختباري النترات والنتريت نتائج سلبية. على حين يكون اختبار النشادر إيجابياً (تصبغ القطرة بلون أصفر ارجواني) والسبب يعود إلى أن جزءاً من النترات يتحول إلى نشادر (نشدرة النترات). إلا أن الجزء الأساسي من آزوت النترات يتحوّل إلى آزوت جزيئي.وهذا ما يستدل عليه بانطلاق غازي CO_2 و N_2 بشكل كثيف.

الدراسة المجهرية للبعض مسببات عملية انطلاق الآزوت (عكس التأزت) :

يتم التعرف على بكتريا انطلاق الآزوت، بأن يؤخذ بواسطة ممص قطرة من

الوسط المغذي ويُجهز منها محضر الخلايا المثبتة والملونة ، ويُشاهد تحت المجهر بالعدسة الغاطسة . يلاحظ في المحضر وجود عصيات غير متبوغة عبارة عن *Pseudomonas denitrificans*.

ملاحظة: يمكن حساب تعداد بكتريا انطلاق النتروجين بطريقة العدد الأرجح Most Probable Number (MPN) (راجع الفصل الثامن).

تثبيت الآزوت
Nitrogen Fixation

أولاً– تثبيت الآزوت غير التكافلي (التثبيت الحر) Asymbiotic Nitrogen Fixation

تسمى العملية التي يتم فيها تمثيل الآزوت الجزيئي الجوي من قبل الكائنات الحية الدقيقة بعملية تثبيت الآزوت، حيث تقوم بكتريا تثبيت الآزوت الجوي بتحويل الآزوت الجزيئي إلى مواد عضوية تدخله في بروتين خلاياها .

يمكن تقسيم البكتريا المستخدمة للآزوت الجوي إلى بكتريا تكافلية ،متعايشة مع النبات. ولا تكافلية تعيش بشكل حر في التربة . وأهم جنسين منتميين إلى البكتريا المثبتة للآزوت الجوي بشكل لا تكافلي هما: *Clostriduium* و *Azotobacter*

- ***Clostriduium pasteurianum*** :

وهي عبارة عن عصيات متبوّغة لا هوائية إجبارياً، تسبب تخمر حمض الزبدة، حيث يعتبر تخمر حمض الزبدة بالنسبة لهذه البكتريا مصدر الطاقة الضرورية لعملياتها

الاستقلابية ولتثبيت الآزوت الجوي.

Cl.pasteurianum ذات متطلبات غذائية بسيطة حيث يمكنها استخدام أشكال مختلفة من المواد الكربوهيدراتية مثل: السكريات الأحادية والثنائية وبعض السكريات المتعددة (دكسترين – نشاء) وأحماض عضوية . وكمصدر للآزوت يمكنها استخدام الآزوت الجزيئي .

تثبت *Cl.pasteurianum* ما يعادل (3-4) ملغ آزوت، وفي ظروف معينة (10-12) ملغ آزوت لكل (١) غ سكر مستخدم (مستهلَك).

التجربة :

١- لدراسة بكتريا الجنس *Clostridium* يمكن استخدام وسط مغذٍ خالٍ من الآزوت هو وسط فينغرادسكي المكوّن من (غ/ ليتر ماء مقطر) :

غلوكوز –٢٠، K_2HPO_4-١، $MgSO_4.7H_2O$–٠.٥، NaCl-٠.٥ $CaCO_3$ -٢٠، ولإظهار *Cl.pasteurianum* تحديداً ، يُستخدم الوسط المغذي التالي (وسط يمسوف) المكوّن من غ/ليتر ماء مقطر.

NaH_2PO_4 -٠.٥، K_2HPO_4 -٠.٥ ، $MgSO_4.7H2O$ –٠.٥، NaCl -٠.٥، $FeSO_4$ -٠.٠١، $MnSO_4.4H_2O$ -٠.٠١، غلوكوز-٢٠، مستخلص الخميرة – 0,2 مل ، $CaCO_3$-١٠ .

٢- يملأ $\frac{2}{3}$ حجم حوجلات (أرلينات) سعة (100) مل بالوسط المغذي، ويُضاف مقدار $\frac{1}{3}$ ملعقة شاي تربة وتسدّ الحوجلات بغطاء قطني، وتزوّد بلصاقة مدوّن عليها: فئة الطالب، الاسم. وتُحضَّن الحوجلات عند (٢٨-٣٠) ْم. هذا ويمكن إجراء التجربة أيضاً في أنابيب اختبار كبيرة .

٣- بعد بضع أيام (٤-٥) يوم يُلاحظ تعكر الوسط ، وتشكل الغازات .

النتائج:

- **الفحص المجهري :**

يمكن أن توجد *Cl.pasteurianum* في قاع الحوجلات مترسبة مع $CaCO_3$

والتربة. يتم رج محتويات الحوجلات وتترك قليلاً ليتسنى ترسب الأجزاء الكبيرة من التربة. بعد ذلك يؤخذ بواسطة ممص قليل من السائل (من وسط الحوجلة) ويوضع قطرة منه على شريحة زجاجية، يُضاف إليها قطرة من محلول اليود في يودات البوتاسيوم (محلول لوغول)، تُغطى بالساترة الزجاجية وتشاهد تحت المجهر باستخدام العدسة الغاطسة بعد وضع قطرة من زيت الأرز. يُلاحظ احتواء *Cl.pasteurianum* على الغرانولاز الذي يتلون بالأزرق نتيجة صبغها بمحلول لوغول. تبدو خلايا *Cl.pasteurianum* مغزلية الشكل محتوية على أبواغ بيضاوية. ارسم ما تراه بالألوان.

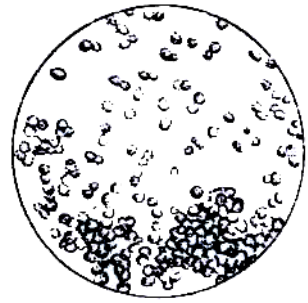
- **التفاعل النوعي لحمض الزبدة:**

يعتبر حمض الزبدة من المنتجات الاستقلابية لل *Cl.pasteurianum*. ويمكن الكشف عنه بإجراء تفاعل كلوريد الحديد: حيث يضاف إلى (٥) مل من الوسط المنقول إلى أنبوب اختبار، (٢) مل كلوريد الحديد. يُسَخّن الأنبوب حتى الغليان. فيتشكل لون أحمر دموي أو أحمر كرزي، دليل وجود حمض الزبدة في الوسط وفق التفاعل التالي :

$$3Ca(CH_3CH_2CH_2COO)_2+2FeCl_3=2Fe(CH_3CH_2CH_2COO)_3+3CaCl_2$$

Azotobacter chroococcum:

وهي عصيات قصيرة وغالباً ما تكون مكوّرة، هوائية، تتجمع خلاياها مثنى مثنى، تشكل محافظ مخاطية، تحميها من ظروف الوسط غير المناسبة (الجفاف مثلاً). مع تقدم الـ *Azotobacter* في العمر تتحول إلى أشكال كرويُة (الشكل-٦١).



(الشكل-٦١) ***Azotobacter chroococcum***

عرف حتى الوقت الحاضر عشرة أنواع من الأزوتوباكتر تبدي تشابهاً كبيراً فيما بينها من الناحية المورفولوجية والفيزيولوجية. وأكثر الأنواع المدروسة هي *Az.vinelandii*؛ *Az.agile Az.chroococcum*ويعتبر *Az.chroococcum* أكثر الأنواع انتشارا في التربة. حيث يشكل على الأوساط المغذية الصلبة مستعمرات بنية.

تستخدم بكتيريا الأزوتوباكتر كمصدر للكربون: المواد الكربوهيدراتية والكحول والأحماض العضوية وخصوصاً حمض الزبدة وحمض الخلّ.

يمكن للآزوتوباكتر أن تثبت من (١٠-٢٠) ملغ آزوت من كل (١) غ من المواد العضوية المستهلكة .

تعتبر الآزوتوباكتر من الكائنات الحية الدقيقة ذات المتطلبات الغذائية الكثيرة على خلاف الـ *Clostridium* وهذا ما يفسر محدودية انتشارها في التربة بالمقارنة مع *Cl.pasteurianum* كما تفضل الآزتوباكتر النمو في الأوساط المعتدلة أو خفيفة الحموضة.

يعتبر الـ *Az.Beijerinckia* أكثر الأنواع قرباً من الآزوتوباكتر لكنه يختلف عنه بقدرته على مقاومة حموضة الوسط (يمكن أن ينمو في الوسط حيث الـ pH=3)

التجربة:

١- يجهز الوسط المغذي المكون من (غ/ليتر ماء مقطر) : K_2HPO_4 –٠.٢ ، $MgSO_4$ –٠.٢، K_2SO_4 –٠.١ ، $CaCO_3$–٠.٢ ، سكروز – 20، آجار– 20.

٢- تجهز زجاجتا ساعة معقمتان توضع في إحداهما التربة المراد دراستها وفي الأخرى ماء معقم.

٣- يعقم قضيب زجاجي ذو نهاية رفيعة نسبياً بالتلهيب، ثم يُغمس في الماء المعقم ليبرد وتُؤخذ بواسطته كتلة من التربة بقطر ٢مم تقريباً وتوضع على سطح طبق بتري. وفي كل مرة يتم تعقيم القضيب الزجاجي وتبريده بالماء المعقم وأخذ كتلة من التربة حتى يتم توزيع (٥٠) كتلة من التربة على شكل خطوط على كامل مساحة طبق بتري.

٤- توضع الأطباق في مجفف (أكسيكاتر) يحتوي على وعاء فيه ماء وذلك لتكوين جو رطب ثم يوضع مجفف (الأكسيكاتر) في الحاضنة عند (٢٩-٣٠)مْ (لا توضع الأطباق مقلوبة).

٥- بعد (5-6) أيام من تحضين الأطباق ضمن الظروف آنفة الذكر، تدوّن النتائج.

النتائج:

- يلاحظ نمو مستعمرات الأزوتوباكتر مخاطية المظهر حول كتل التربة، ففي حال اكتسبت هذه المستعمرات مع مرور الزمن لونا بنياً؛ كان ذلك دليلاً على وجود *Az.chroococcum*. وفي حال كان للمستعمرات لون أخضر يمكن عندها أن تكون إما مستعمرات *Az.agile* وإما *Az.vinelandii* (عادة *Az.agile* تعيش في الماء) أما *Az.Beijerinckia* فتشكل مستعمرات مخاطية عديمة اللون.
- **الدراسة المجهرية:** يتم تجهيز محضر من المستعمرات النامية حول كتل التربة ويثبت كالمعتاد ويصبغ بأزرق الميتلين (٢-٣) دقائق ويشاهد بالعدسة الغاطسة يمكن ملاحظة خلايا الآزوتوباكتر حيث تظهر غالباً مثنى مثنى، كما يمكن ملاحظة المحافظ المحيطة بالخلايا عن طريق إجراء الصبغ السلبي ارسم ما تراه.

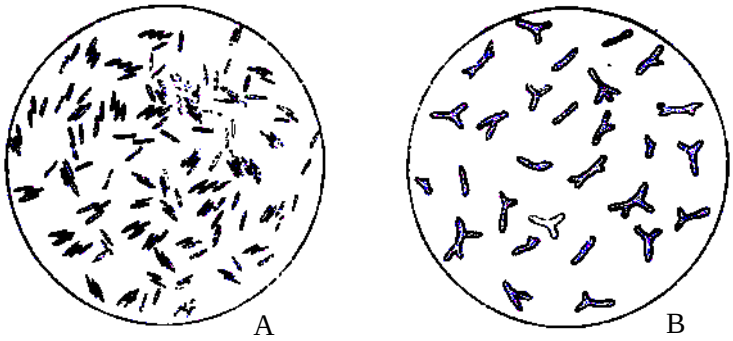
ثانياً– تثبيت الآزوت تكافلياً (بالتعايش) Symbiotic Nitrogen Fixation:

تنسب بكتريا العقد الجذرية (الجنس *Rhizobium* مثلاً) إلى البكتريا المثبتة للآزوت تكافلياً.وهي تعيش في عقد موجودة على جذور النباتات البقولية حيث يتم تثبيت الآزوت بشكل تكافلي ضمن هذه العقد الجذرية.

تأكّدَ في الوقت الحاضر أن بكتريا العقد الجذرية تقوم بتثبيت الآزوت ليس فقط في ظروف تكافلية مع النباتات البقولية ولكن أيضاً عندما تكون على شكل مزارع نقية نامية على أوساط مغذية خاصة .

تشكل بكتريا العقد الجذرية خلايا ضخمة ومتفرعة على شكل حرف T أو Y وتكون عادة أكبر من الخلايا العادية وتسمى بالبكترويدات Bacteroids وهي غير

متحركة وقد تبين أن عملية تثبيت الآزوت تجري على أشدها عندما تكون بكتريا العقد الجذرية على شكل بكترويد (الشكل-٦٢).



(الشكل-٦٢) بكتريا العقد الجذرية

A-بكتريا فتية **B- بكتريا بعد مرور فترة زمنية**

يمكن لبكتريا العقد الجذرية أن تستخدم مواد مختلفة كمصدر للآزوت مثل: أملاح الأمونيا و الأحماض الآزوتية والأحماض الأمينية وغيرها كما يمكن أن تمثل مواد كربوهيدراتية مختلفة ومن ضمنها بعض السكريات المتعددة وكثير من الأحماض العضوية والكحول.

تعتبر pH المثالية لأغلب أنواع *Rhizobium* ضمن حدود (٦.٦-٧.٥) ويتوقف نموها عند pH=٤.٥-٥ و pH=٨ أما درجة الحرارة المثالية لنموها فهي (٢٥)م.

تتم العدوى بالرايزوبيوم من خلال مناطق فتية من الشعيرات الجذرية حيث تجتذب الشعيرات الجذرية البكتريا وتلتصق بالشعيرات الجذرية ومن ثم تخترقها مشكلة خيط العدوى infection thread وكرد فعل لتغلغل البكتريا تبدأ خلايا الجذر بالانقسام، وتتوقف عن الانقسام بعد دخول البكتريا إليها مباشرةً. ثم تكبر الخلايا النباتية بالحجم وتشكل النسيج البكترويودي Bacteroids تبدو العقد الجذرية المحتوية على خلايا نشطة (فعالة) من الرايزبيوم بلون محمر وذلك لوجود صبغة الليغهيموغلوبين Leghemoglobin المشابهة للهيموغلوبين.

يمكن من جراء تثبيت الآزوت من قبل بكتريا العقد الجذرية أن تغني التربة بالآزوت بكمية تصل إلى (١٠٠-٢٠٠) كغ/هكتار سنوياً وذلك حسب المحصول البقولي المزروع.

دراسة العقد الجذرية

تختلف أشكال وأحجام العقد الجذرية حسب النبات فعند نبات البرسيم مثلاً تبدو مستطيلة وصغيرة، وعند الحمّص والكرسنّة مدوّرة وكبيرة، ويمكن أن يصل قطر العقدة عند الفاصولياء والصويا إلى (١سم). يمكن دراسة العقد على النحو التالي :

١- بعد نزع العقد الجذرية من نبات بقولي نُغسل بالكحول ثم بالماء المعقم.
٢- يُعمل من العقد مقاطع رقيقة طولانية أو عرضانية وذلك بواسطة شفرات حادة أو بواسطة جهاز عمل المقاطع (المكروتوم).
٣- توضع المقاطع على شريحة زجاجية ويعمل منها محضرات وتُشاهد تحت المجهر بتكبيرات مختلفة حيث يُفحص تركيب العقد الجذرية أولاً بالعدسات الجافة ثم بالعدسة الزيتية الغاطسة.

دراسة بكتريا العقد الجذرية

١- في حال كانت العقد الجذرية كبيرة تقسم إلى قسمين بواسطة شفرة حادة. ويتم بواسطة إبرة معقمة تهشيم (هرس) أحد الأقسام ما أمكن ويعصر منه قطرة توضع على شريحة زجاجية ويجهز محضر من الخلايا المثبتة والملونة.
٢- في حال كانت العقد الجذرية صغيرة : يوضع (٢-٣) عقدة على شريحة زجاجية ويضاف فوقها قطرة ماء. وبواسطة شريحة زجاجية ثانية يضغط على الشريحة الأولى المحتوية على العقد. يتم توزيع المحتويات المضغوطة (محتويات العقد الجذرية) على الشريحة الزجاجية باستخدام الإبرة اللاقحة ثم يجفف الغشاء ويثبت كالمعتاد ويصبغ بإحدى الصبغات التالية : الإيروتريوزين أو الفوكسين أو الجنسيان البنفسجي ويمكن الحصول على صبغة جيدة في حال استخدام خليط من الفوكسين وأزرق الميتلين

المذاب في ١%من حمض الخل حيث يتم صبغ المحضر بهذا الخليط لمدة (٣-٥) دقائق .

النتيجة:

تُصبغ نسج العقد الجذرية بلون أزرق أما البكتريا فتكون بلون أحمر.

يمكن الحصول على مزارع من بكتريا العقد الجذرية بإتباع ما يلي :

١- يُغسل قسم من الجذور الحاوية على العقد الجذرية بواسطة ماء معقم.

٢- تعقم أسطح العقد الجذرية بمحلول كحولي ويُغسل من جديد بماء معقم.

٣- تُهرس العقد الجذرية بواسطة حربة وذلك بعد وضع قطرة معقمة من الماء ونتيجة الهرس سينتج معلقّ.

٤- يُزرع المعلّق على الوسط المغذي التالي (غ) الموزع في أطباق بتري:

مانيت (سكروز أو غلوكوز) -10؛ KH_2PO_4 -٠.٠٥؛ $MgSO_4$-٠.٢ ، $NaCl$ -٠.١، $CaCO_3$-٣ ؛ ماء خميرة (pH=6.8)-100 مل؛ آجار -20؛ ماء مقطر 0.9 ليتر .

٥- تحضن الأطباق على درجة حرارة (٢٥)م لمدة (٥) أيام.

النتيجة:

تظهر على الأطباق مستعمرات مخاطيّة القوام، يجهز محضر الخلايا المثبتة ويُصبغ بطريقة غرام، يُلاحظ أن خلايا الرايزوبيوم عصوية غير متبوغة سالبة لغرام.

تحلل السيللوز

أولاً – التحلل اللاهوائي للسيللوز:

يتحلل السيللوز في الظروف اللاهوائية بفعل بكتريا متبوغة منتشرة في التربة والدبال وفي كرش الحيوانات المجترّة وتتم عملية تحلل السيللوز كالآتي:

١- حلمهة السيللوز وتشكل سكريات ثنائية (سلوبيوز) وأحادية (غلوكوز)

$$(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O \rightarrow nC_{12}H_{22}O_{11}$$
$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$$

٢- تخمر السكريات الأحادية (الغلوكوز)

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CH_2CH_2COOH + CH_3COOH + CH_3CH_2OH + CH_3CHOHCOOH + HCOOH + CO_2 + H_2$$

تنتمي أغلب البكتريا اللاهوائية المحللة للسيللوز إلى الجنس *Clostridium* وقد وجدت هذه البكتريا في التربة وفي الدبال ويعتبر النوع *Cl.omalianckii* من أهم الأنواع المحللة للسيللوز حيث تحلله عند (٣٠-٤٠)مْ .

وهذه البكتريا عصوية الشكل ومتحركة و متبوغة. تتبع إلى البكتريا المحللة للسيللوز المحبة للحرارة المعتدلة. ومن بين البكتريا اللاهوائية المحللة للسيللوز والمصادفة في التربة أو الدبال، أنواع ذوات متطلبات حرارية عالية من بينها على سبيل المثال *Clostridium thermocellum* درجة الحرارة المثالية لنموها (٦٠)مْ.

هذا وتعتبر عملية تحلل السيللوز لا هوائياً مهمّة للغاية في دورة المواد الكربوهيدراتية بالطبيعة.

التجربة:

الكشف عن البكتريا المحبة للحرارة المتوسطة المحللة للسيللوز لاهوائياً:

١- يوضع في حوجلة حوالي (١-٢) غ من ورقة الترشيح المقصوص إرباً إرباً (يمكن استخدام القطن أيضاً).

٢- يصب في كل حوجلة الوسط المغذي % حتى فوهة الحوجلة :

بيتون -٠.١	KNH_4HPO_4 -٠.٢
$MgSO_4$ -٠.٠٥	KH_2PO_4 -٠.٢
$CaCO_3$ -٠.٥	CaCl -٠.٠٣

٣- يعقم الوسط المغذي الموزّع في الحوجلات بالصاد الموصد عند (١٢١)مْ لمدة (٢٠) دقيقة .

٤- تُضاف كمية قليلة من التربة وتُغلق الحوجلات بسدادات مزودة بفتحة (أنبوب) لخروج الغاز.

وهكذا فإن الظروف الانتخابية في هذه الحالة قد تحددت بالعوامل الآتية :

- وجود السيللوز كمصدر للمواد الكربوهيدراتية الذي يمكن أن يُستخدم فقط من قبل البكتريا المحللة للسيللوز والتي تحوي على أنزيم السيلولاز.
- الظروف اللاهوائية التي تشكلت نتيجة تعبئة الوسط المغذي إلى فوّهة الحوجلات.
- إن وجود البيتون بكميات ضئيلة ضمن مكونات الوسط لا يخرّب من انتخابية الوسط ولكن يسرّع من عملية تحلل السيللوز بدرجة كبيرة .

٥- تحضن الحوجلات عند (٣٠-٣٥)مْ لمدة (٢-٣) أسابيع.

ضمن هذه الظروف تبدأ عملية تخمر السيللوز وكلما ازداد معدل التخمر اصفرت ورقة الترشيح وتحلّلت من قبل البكتريا.

النتيجة :

يؤخذ بواسطة ملقط معقم قطعة صغيرة من ورق الترشيح الموجودة في أسفل الحوجلة وتوضع على شريحة زجاجية (دون إضافة للماء) وتجري خطوات تجهيز المحضر؛ حيث يجفف الغشاء ويثبت على اللهب ويصبغ بالفوكسين ويشاهد تحت المجهر بالعدسة الغاطسة. عندها يمكن ملاحظة *Clostridium omalianskii* وهي عبارة عن عصيات طويلة ورفيعة وذات نهاية مدورة نتيجة وجود البوغة في الطرف. (الشكل-٦٣)

A **B** **C**

A- خلايا فتية **B- خلايا مع أبواغ** **C- أبواغ**

(الشكل–٦٣) ***Clostridium omalianskii***

الكشف عن البكتريا المحبة للحرارة المرتفعة المحللة للسيللوز لاهوائياً

١- يجهز الوسط المغذي المكون من (غ/ ليتر ماء مقطر):

$MgSO_4$ - 0.4	$NaNH_4HPO_4$ -1
NaCl - 0.1	KH_2PO_4 - 0.5
$FeSO_4$ كميات قليلة جداً	KH_2PO_4 - 0.5
MnSO	٠.٥ – بيتون

$CaCO_3$ - 0.5

٢- يوضع في قاع أنابيب اختبار قطع صغيرة من ورق الترشيح ويصب الوسط المغذي ليحتل $\frac{2}{3}$ من الأنبوب، تُعقّم الأنابيب بالصاد الموصد عند (١٢١) مْ لمدة (٢٠) دقيقة.

٣- تضاف كمية قليلة من الدبال (يفضل دبال الخيل) وتحضن الأنابيب عند (٦٠)مْ بعد بضعة أيام يبدأ خروج الغاز بشدة وتكتسب أوراق الترشيح لوناً أصفر وتتآكل الأوراق شيئاً فشيئاً.

النتيجة:

يتم بواسطة ملقط أخذ كمية صغيرة من ورق الترشيح وتوضع على شريحة زجاجية ويُجهز محضر كالمعتاد ويُفحص تحت المجهر. يُلاحظ عند الفحص المجهري وجود عصيات كبيرة وطويلة تتوضع في أطرافها أبواغ فتكسبها شكلاً إجاصياً. هذه البكتريا هي عبارة عن *Cl.dissolvens* .

ثانياً – التحلل الهوائي للسيللوز (أكسدة السيللوز)

إن أغلب كمية السيللوز التي تكون على شكل بقايا نباتية توجد على السطح العلوي للتربة حيث تتحلل من قبل الكائنات الحية الدقيقة (بكتريا – أكتينومايسيتس– فطريات) في عام ١٩١٩ م تمكن العالمان هشينستون وكلينتون من عزل نوع بكتيري يقوم بتحليل السيللوز هوائياً في التربة وقد تم وصفه بأنه عبارة عن خلايا عصوية طويلة معوجة

ذات نهايات حادة، وأُعْطي هذا الكائن الدقيق آنذاك تسمية *Spirochaeta cytophage* أما في الوقت الحاضر فإنه ينسب إلى الجنس *Cytophage*.

تعتبر البكتريا المنتسبة إلى الجنس *Cytophage* ذات متطلبات غذائية كثيرة وتوجد عادة في الدبال والترب المسمدة به. ومن الأجناس الأخرى المحللة للسيللوز هوائياً *Sporocytophage* وكذلك *Sorangium* و *polyangium* يمكن أن توجد في الترب الغنية بأشكال الآزوت المعدني الأنواع التابعة للجنس *Cellvibrio* المحللة للسيللوز هوائياً.

يتم تحلل السيللوز أيضاً في الظروف الهوائية من قبل الأكتينومايسيتس والفطور والـ *Nocardia* . يجري التحلل البيوكيميائي للسيللوز هوائياً على النحو التالي :

تفرز الكائنات المحللة للسيللوز إنزيمي السيللوز *Cellulase* والسيللوبياز *Cellobiase* التي تُحَلْمه السيللوز حتى الغلكوز والذي يتأكسد بدوره إلى CO_2 وH_2O حسب التفاعل الآتي:

$$nC_6H_{12}O_6 + XO_2 \rightarrow R-CHOHCOOH + CO_2 + H_2O + Q$$
$$R-CHOHCOOH + XO_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + Q$$

يستخدم الغلوكوز من قبل الخلايا لإنتاج الطاقة كما يستعمل كمصدر للكربون.

التجربة:

١- يُجهّز الوسط المغذي التالي (غ/ليتر ماء مقطر) والمسمى بوسط Dubos يوزع في حوجلات سعة كل منها (١٥٠) مل بواقع (٣٠) مل في كل حوجلة:

KH_2PO_4 - 1	KCl - 10.5
$MgSO.7H_2O$ – 0.5	$NaNO_3$ - 0.5
	$FeSO.7H_2O$ - 0.01

يضاف إلى الوسط ورق ترشيح بحيث يكون جزءاً منها داخل الوسط المغذي والجزء الآخر ممتد خارج الوسط بحوالي (٢-٣) سم تعقم الحوجلات بالصاد الموصد عند (١٢١)مْ لمدة (٢) دقيقة.

٢- يضاف إلى الوسط حوالي $\frac{1}{3}$ ملعقة شاي من التربة المدروسة .

٣- تحضّن الحوجلات المزروعة عند (٢٨-٣٠)مْ لمدة أسبوعين.

النتائج :

ستنمو على ورقة الترشيح وعلى الحد الفاصل بين الهواء و الحوجلة والوسط المغذي البكتريا المحللة للسيللوز هوائياً وتصبح ورقة الترشيح مخاطية تدريجياً وذات لون مصفر.

في أثناء الفحص المجهري للمحضرات يمكن ملاحظة أنواع مختلفة من البكتريا المحللة للسيللوز هوائياً هي: (الشكل-٦٤)

Cytophage : خلاياها الفتية معقوفة قليلاً طويلة (٣-٨) ميكرومتر وذات نهايات حادة تتحول عند تقدمها بالعمر إلى عصيات قصيرة ذات نهايات مستديرة .

Polyangium و Sorangium : الخلايا الفتية منها عصوية وعند التقادم بالعمر يجتمع كل (١٢-١٤) منها مع بعضها على شكل أجسام ثمرية وتشكل خلاياها لطخاً مخاطية ذوات ألوان مختلف إما صفراء أو وردية أو بنية غامقة

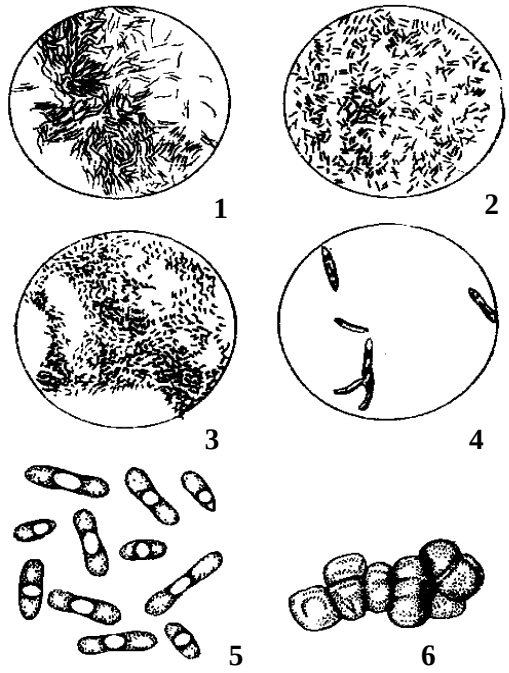
Cellvibrio : عصيات معقوفة منحنية قليلاً تظهر على ورقة الترشيح بلون أخضر.

Cellfalciula : عصيات ثخينة عند المركز ذوات نهايات حادة تبدو مستعمراتها على ورقة الترشيح بلون أخضر أيضاً.

ملاحظة: كما ذكر سابقاً تقوم **الفطريات** أيضاً بتحليل السيللوز وبشكل فعال وخصوصاً الفطريات التابعة للأجناس: *Trichoderma Cladosperium , Dematium Fusarium , Altrnaria , Sachypotris*

كما أن **الأكتينومايسيتس** تشارك في تحلل السيللوز هوائياً مثل :

Micromonospora chalceae , A.cellose , Actinomyces violaceus



(الشكل– ٦٤) بعض البكتريا المؤكسدة للسيللوز

1- Cytophage *2- Cellvibrio* *3-Cellfalcicula*
4- Polyangium *5- Sorangium*
6- Polyngium أجسام ثمرية للجنس

تحول مركبات الكبريت

أكسدة كبريت الهيدروجين:

يتم أكسدة كبريت الهيدروجين إلى H_2SO_4 في التربة نتيجة لفعل بكتريا الكبريت. تقسم بكتريا الكبريت إلى مجموعتين: الأولى بكتريا الكبريت الملوّنة. والثانية بكتريا الكبريت غير الملوّنة، وتتبع الأخيرة الأنواع التابعة للجنس *Beggiatoa* وهي عبارة عن بكتريا خيطية طويلة والأنواع التابعة للجنس *Triothrix* وهي خلايا غير متحركة تفرز قطرات الكبريت إما داخل وإما على سطح الخلايا، ويمكن لهذه البكتريا أن تقوم بتمثيل CO_2 على حساب الطاقة الناتجة عن أكسدة H_2S. وفي الوقت نفسه فإن هذه البكتريا متطلبة للمركبات العضوية. ويتبع للبكتريا الملونة البكتريا الأرجوانية و الخضراء الحاوية الكلوروفيل وبالتالي تستخدم هذه البكتريا الضوء، وعملية التمثيل

الضوئي التي تقوم بها تتم في ظروف لا هوائية ولا يرافق هذه العملية انطلاق للأوكسجين .

تستخدم هذه البكتريا H_2S كواهب للإلكترونات لتمثيل CO_2 فهي بذلك ذاتية التغذية ضوئياً. أما البكتريا التابعة للجنس ***Thiobacillus*** فهي عبارة عن خلايا مفردة صغيرة تقوم في أثناء أكسدتها لكبريت الهيدروجين بتراكم الكبريت على سطح خلاياها وليس في داخل خلاياها، والطاقة الناتجة عن أكسدة مركبات الكبريت تستخدم من قبل هذه البكتريا لاستمرار عملياتها الحيوية ولإرجاع مركباتها الكربوهيدراتية إلى CO_2، وهي تتبع حكماً إلى البكتريا ذاتية التغذية كيميائياً .

التجربة :

أولاً – الحصول على بكتريا الكبريت :

١- اقترح العالم فينغرادسكي القيام بوضع قليل من الطين والجبس (لزيادة إفراز H_2S) في أسفل سلندر طويل مع إضافة بعض بقايا نباتات مائية ومن ثم يملأ السلندر حتى الأعلى (الفوّهة) بالماء (عمود فينغراديسكي).

٢- بعد شهر تقريباً يظهر على السطح طبقة بيضاء مصفرة هشة عبارة عن خيوط كبيرة من بكتريا الكبريت مع رواسب الكبريت التي تبدو على على شكل قطرات. أكثر الأنواع توافراً هي تلك التابعة للجنس ***Beggiatoa*** .

٣- يمكن التأكد من الكبريت الموجود بالخلايا باتباع الطريقة التالية :

أ- عند إضافة قطرة من ثاني كبريتيد الكربون إلى محضّر من خلايا ***Beggiatoa*** يُلاحظ ذوبان قطرة الكبريت السائل بداخلها .

ب- في حال نقل خلايا ***Beggiatoa*** المحتوية قطرات من الكبريت إلى ماء نظيف غير محتوٍ على H_2S يلاحظ اختفاء الكبريت تماماً بعد بضع ساعات.

ثانياً– الكشف عن *Thiobacillus* :

١- يحضر الوسط المغذي التالي من (غ/ليتر ماء مقطر)

$Na_2SO_4 - 5$ NH_4Cl - 0.1

$NaHCO_3$ – 1 $MgCl_2$, $6H_2O$ - 0.1
K_2HPO_4 - 2

٢- يوزّع الوسط المغذي في حوجلات (أرلينات) سعة (١٥٠) مل وذلك بواقع (٣٠-٥٠) مل في كل حوجلة وتلقح بتربة طمييّة (مقدار ملعقة صغيرة)

٣- يجري تحضين الحوجلات عند (٣٠)مْ لعدة أيام.

النتيجة:

بعد التحضين يظهر في الوسط المغذي الكبريت الحرّ ويمكن الكشف عن بكتريا *Thiobacillus thioparus* بإجراء الدراسة المجهرية.

ثالثاً– للحصول على مزرعة من بكتريا الكبريت التي تقوم بالتركيب الضوئي:

١- يحضر الوسط التالي وسط (فان –نيل) المكون من (% ماء مقطر)

KH_2PO_4 - 0.1 $NaHCO_3$ - 0.5
$MgCl_2$. $6H_2O$ - 0.05 NH_4Cl - 0.1
NaCl - 0.5 Na_2S . H_2O - 0.1

ويفضل إضافة (٠.١ -٠.٢%) من أملاح الأحماض العضوية مثل خلات الصوديوم أو سوكسينات الصوديوم ذلك لأن الكثير من البكتريا الضوئية (المستخدمة للأشعة الضوئية) تنمو جيداً بوجود المواد العضوية، ثم يُضبط pH الوسط عند (٧-٧.٥).

٢- يوضع (٥-١٠) مل من المادة المدروسة (مياه مأخوذة من مصادر مختلفة) في حوجلات مصنفرة سعة (١٠٠-١٥٠) مل ثم يضاف الوسط المغذي حتى فوهة الحوجلة. وعند إغلاق الحوجلات بالغطاء الزجاجي سينسكب قليل من الوسط المغذي من جوانب الحوجلات وبهذه الطريقة يمكن تكوين ظروف لا هوائية (باعتبار أن عملية التركيب الضوئي تتم في ظروف لاهوائية)

٣- تنقل الحوجلات لتوضع في حاضنة مزودة بمصدر ضوئي وذلك عند (٣٠)مْ لمدة (٤-٥) أيام .

النتيجة :

بعد انتهاء فترة التحضين تنمو في الوسط المغذي بكتريا الكبريت الأرجوانية أو الخضراء (وهذا بالطبع يتوقف على المادة الأولية المزروعة بالحوجلات) ففي حال وجود البكتريا الأرجوانية فإن الوسط في البداية يتلون بلون وردي ومن ثم لون أحمر، أمّا في حال وجود البكتريا الخضراء فيتلون الوسط بلون أصفر مخضر.

للتعرف على محتويات الوسط من البكتريا يتم تجهيز محضرات الخلايا الحية (القطرة الرطبة).عند مشاهدة المحضرات بالعدسة الغاطسة يمكن ملاحظة خلايا متحركة من البكتريا محتوية على مدخرات كبريتية .

إرجاع السلفات :

يرافق تحلل المواد العضوية المحتوية على مواد كبريتية (بروتينات الأحماض العضوية) انطلاق لغاز كبريت الهيدروجين ويتشكل الأخير أيضاً نتيجة إرجاع السلفات والثيوسلفات حيث تطلق البكتريا المرجعة للسلفات أثناء عملية التنفس السلفاتي كميات كبيرة من غاز كبريت الهيدروجين، وتختلف البكتريا المرجعة للسلفات عن بكتريا انطلاق الآزوت (عكس التأزت) بكونها لاهوائية إجبارياً .

تستخدم هذه البكتريا بشكل رئيسي الحموض العضوية والكحولات والهيدروجين الجزئي كمواد معطية للإلكترونات (الهيدروجين)، والسلفات بوصفه مستقبلاً للهيدروجين (الإلكترونات)، علماً أنه يتم تأكسد المواد العضوية حتى النهاية. وفي أغلب الأحيان يكون حمض الخلّ أحد نواتج الأكسدة .

$$4CH_3COCOOH + H_2SO_4 = 4CH_3COOH + 4CO_2 + 2H_2O$$

في الواقع تستطيع مجموعة قليلة من الأحياء الدقيقة استخدام أوكسجين السلفات في عملية التنفس فمن بين البكتريا التابعة للجنس *Desulfuricans* هناك *D.vulgaris*. ومن بين البكتريا التابعة للجنس *Desulfotomaculum* هناك *D.nigricans* وتتوافر هذه البكتريا في مياه الطمي حيث تتم عملية تحلل للمواد العضوية في ظروف لاهوائية وكذلك

في البرك الملوثة. يمكن أن يصل تعداد هذه البكتريا في (١) مل في السائل إلى 10^{-6} – 10^{-7} خلية.

التجربة:

١- يجهز الوسط المغذي(فان –ديلدين) المكون من غ/ليتر من الماء المدروس:
أوكسي بريبونات الصوديوم (يمكن استبدالها بأملاح حمض التفاح أو الطرطريك)–٥ ، أسباراجين –١، $MgSO_4.7H_2O$ -1 ، K_2HPO_4-0.5 ، pH=7 ينصح بإضافة ٠.١-٠.٥ غ من سترات الحديد. عند تشكل H_2S يصبح لون الوسط أسود.

٢- يصب في حوجلات زجاجية من (٥-١٠) مل من الماء المراد دراسته (من مصادر مياه ملوثة) أو ماء يحوي على H_2S ثم يضاف عليه وسط فان –ديلدين بحيث يحتل الوسط كامل حجم الحوجلات التي يخترقها أنبوبة منتفخة من الوسط (انظر انطلاق الآزوت) فعند إغلاق الحوجلة بهذه الأنبوبة سوف يرتفع الوسط المغذي في الأنبوبة .

٣- يُضاف من خلال الأنبوبة زيت الفازولين وذلك لتشكيل ظروف لاهوائية .

٤- تُحَضّن الحوجلات المعاملة بهذه الطريقة عند (٢٨-٣٠)مْ لعدة أيام .

النتيجة:

يمكن الكشف عن تشكيل H_2S بإضافة سترات الحديد إلى الوسط المغذي فيصبح الأخير أسود اللون .

تحول مركبات الفوسفور

تلعب الكائنات الحية الدقيقة دوراً مهماً في تزويد النباتات بأشكال الفوسفور المتاح.

- **تحول المركبات الفوسفورية العضوية:**

يتواجد حوالي (٣٠- ٣٥)% من الفوسفور في التربة بشكل عضوي والفوسفور العضوي غير متاح بشكل جيد للنبات، ويوجد عادة على صورة مركبات فوسفورية عضوية (أحماض نووية، دهون فوسفورية...).

للكائنات الحية الدقيقة المنتجة لأنزيم الفوسفاتاز القدرة على نزع حمض الفوسفور من مركبات الفوسفات العضوية وعند تفاعل حمض الفوسفور مع الكاتيونات؛ تتحول أملاح حمض الفوسفور القابلة للاستفادة من قبل النبات.

التجربة :

لملاحظة عملية نزع الفوسفور من مركبات الفوسفات العضوية يتم اتباع ما يلي:

١- يوزع في في أطباق بتري معقمة الوسط المغذي المكوّن من:

- وسط المرق المغذي ١٠٠٠ مل
- حمض نووي (أوليسيتين) ٥ غ
- آجار ٣٠ غ

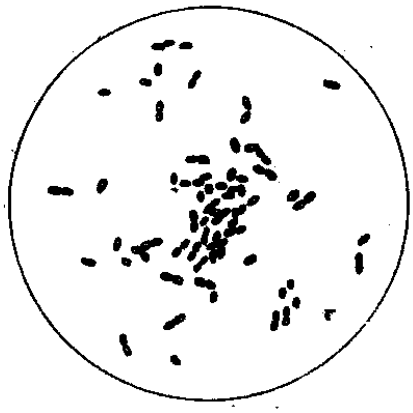
٢- تجهز التخفيفات المتتالية ويؤخذ من التخفيفين 10^{-2} — 10^{-3} كمية محدودة وتوضع في أطباق بتري.

٣- تُنشر الكمية الموزعة بواسطة الإبرة اللاقحة أو بواسطة الماسحة الزجاجية على كامل سطح الأطباق زرع سطحي.

٤- تحضن الأطباق المزروعة عند (٢٨-٣٠)ْ م لعدة أيام .

النتيجة:

- في حال احتوت التربة على البكتريا المفرزة للفوسفاتاز فإن هذه البكتريا ستقوم بنزع الفوسفور مشكلة حول مستعمراته منطقة من $CaCO_3$ المذابة.
- يمكن عزل بكتريا عصوية متبوغة كبيرة الحجم مرتبطة مع بعضها مثنى مثنى أو على شكل سبحات صغيرة هي عبارة عن *Bac.megaterium var. phosphaticum* (الشكل-٦٥)



(الشكل-٦٥) ***Bac.megatherium var. phosphaticum***

- يلاحظ وجود بكتريا عصوية غير مشكلة للأبواغ تتبع الجنس *Psedomonas* تشارك أيضاً في نزع حمض الفوسفور من الدهون الفوسفورية ومن مركبات الفوسفور العضوية الأخرى.

تحولّ أملاح الفوسفات غير الذوابة مثل $Ca_3(PO_4)$ إلى أشكال قابلة للاستفادة من قبل النبات:

هناك نسبة كبيرة من الفوسفور في التربة موجودة بصورة أملاح صعبة الذوبان مثل $Ca_3(PO_4)$، ولم يثبت وجود كائنات خاصة مذيبة للفوسفات ثلاثية الكالسيوم إلا أن الكائنات الدقيقة تشارك في هذه العملية بشكل غير مباشر، فبكتريا النترجة (التأزت) تقوم بأكسدة الأمونيا مشكلة حمضي الآزوت والآزوتي، وكذلك بكتريا الكبريت المؤكسدة للكبريت وكبريت الهدروجين تشكل حمض الكبريت، وكائنات أخرى تنتج غاز ثاني أكسيد الكربون الذي يتحول إلى حمض الكربون. كل هذه الحموض تتفاعل مع فوسفات الكالسيوم مكونة أملاحه الحمضية القابلة للاستفادة من قبل النبات وفق التفاعلات التالية:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4HNO_3 = Ca(H_2PO_4)_2 + 2Ca(NO_3)_2$$
$$Ca_3(PO_4)_2 + 2H_2SO_4 = Ca(H_2PO_4)_2 + 2CaSO_4$$
$$Ca_3(PO_4)_2 + 2CO_2 + 2H_2O = 2CaHPO_4 + Ca(HCO_3)_2$$

وبشكل مشابه تؤثر البكتريا الأخرى، المشكلة للأحماض العضوية انطلاقاً من المواد الكربو

هيدراتية، على أملاح الفوسفات غير الذوابة فتجعلها أشكالاً قابلة للاستفادة من قبل النبات.

التجربة:

للكشف عن خاصية الإذابة من قبل بعض البكتريا لأملاح الفوسفات غير الذوابة مثل $Ca_3(PO_4)$ بشكل غير مباشر اقترح العالم فيدروف القيام بالآتي:

١- يوضع (٠,١- ٠,٢) غ من $Ca_3(PO_4)_2$ في قعر طبق بتري.

٢- يضاف مستخلص التربة الحاوي على ٢% غلكوز و ٢% آجار مذاب ويتم توزيع $Ca_3(PO_4)_2$ بشكل متجانس على كامل مساحة الطبق وذلك بتحريك الأخير حركة رحوية بسيطة على سطح مستو.

٣- تزرع على الطبق بكتريا منتجة للحموض (بكتريا النترجة، بكتريا أكسدة الكبريت مثلاً)

٤- تحضن الأطباق عند (٢٨-٣٠)مْ.

النتيجة:

عند نمو البكتريا المنتجة للحموض تظهر مستعمراتها محاطة بهالة شفافة من الفوسفات المذاب .

دراسة الأحياء الدقيقة في منطقة نمو المجموع الجذري (الريزوسفير ***Rhizosphere***) وعلى سطوح جذور النباتات

تسمى المنطقة التي يوجد بها نشاط ميكروبي حول جذور النباتات بالريزوسفير. وبشكل عام، كلما كانت التربة أقرب إلى المجموع الجذري، كان محتواها من البكتريا أكثر. وخاصة إذا كانت التربة تقع مباشرة على سطوح جذور النباتات .

تحصل الكائنات الحية الدقيقة في منطقة الريزوسفير بشكل إضافي على مصادر للتغذية تتمثل بمخلفات خلايا الجذور الميتة والإفرازات الجذرية.

تنمو في منطقة الريزوسفير أنواع من الميكروبات مشابهة لتلك الموجودة في التربة خارج منطقة الريزوسفير، غير أنه تسود في التربة المتواجدة على سطوح جذور النباتات بكتريا الـ *Pseudomonas* و *Mycobacteria*. وتتباين الأنواع الميكروبية الموجودة في منطقة الريزوسفير تبعاً لنوع المحصول؛ فمثلاً الميكروبات الموجودة في منطقة ريزوسفير المحاصيل الحبيّة غير تلك الموجودة في منطقة نمو جذور البقوليات أو غيرها من المحاصيل الأخرى، ويعود تفسير ذلك على ما يبدو إلى الاختلاف في طبيعة الإفرازات الجذرية لهذه النباتات.

تلعب ميكروبات منطقة الريزوسفير دور "منظفات بيولوجية" بسبب استهلاكها المنتجات الاستقلابية للنباتات ومعدنتها للبقايا العضوية. وهي في الوقت نفسه تسهم في تحويل الكثير من العناصر الغذائية فتجعلها متاحة للاستخدام من قبل النباتات، علاوة على أن بعض أنواع البكتريا الموجودة في منطقة الريزوسفير تنتج عوامل نمو مثل الفيتامينات وغيرها التي لها دور إيجابي في نمو النبات. غير أنه يزداد في منطقة الريزوسفير نشاط بكتريا انطلاق النتروجين، التي تسهم وضمن ظروف معينة بفقد كبير في آزوت التربة.

- **تقدير الأحياء الدقيقة في منطقة الريزوسفير حسب كراسينلنيكوف:**

١- يُقلع النبات المدروس بواسطة مجرف معقم. ويُقطع مجموعه الجذري بواسطة مقص معقم.

٢- يُنْفَض ما علق من تربة عن جذور النبات في طبق بتري معقم، ثم يُؤخذ ١ غ من هذه التربة ليُعمل منها التخفيفات المتتالية (أُنظر عدّ الأحياء الدقيقة بطريقة الأطباق). ويؤخذ في ذات الوقت كمية من هذه التربة لتقدير رطوبتها.

٣- بعد إجراء التخفيفات المتتالية. يتم اختيار التخفيف المناسب ليؤخذ منه بواسطة ممص معقم ٠.٠٥ مل وتُجرى عملية الزرع على الأوساط المغذية المختلفة التي يتم اختيارها بحسب الهدف من الدراسة.

٤- بعد عملية التحضين التي تختلف درجة الحرارة والمدة الزمنية اللازمة لها بحسب المجموعة الميكروبية المدروسة، يتم إجراء عدّ للمستعمرات النامية ومن ثم تقدير عدد الكائنات الحية الدقيقة في ١ غ تربة جافة تماماً.

٥- ولدراسة الأنواع المختلفة للكائنات الحية الدقيقة الموجودة في التربة. توضع البكتريا ذوات الخواص المزرعية المتشابهة في مجموعات و يُجهز من كل مجموعة محضر يتم مشاهدته تحت عدسة المجهر وذلك لبيان الخواص المجهرية.

٦- وللاستمرار في متابعة الدراسة بغية تعرّف الأنواع السائدة في منطقة الريزوسفير، يتم عزل الميكروبات في أنابيب اختبار الآجار المائل وإجراء اختبارات النقاوة لهذه العزلات ومن ثم القيام بسلسلة من الدراسات المتعلقة بالخواص الشكلية والمزرعية والفيزيوبيوكيميائية وغيرها لهذه الميكروبات.

- **تقدير الأحياء الدقيقة في منطقة الريزوسفير وعلى سطوح جذور النباتات بطريقة الغسيل المتتابع (المتتالي) للجذور حسب تيبر:**

١- يقطع مقدار ١ غ من الجذور الفتية للنبات المدروس على أن تكون هذه الجذور ذوات أقطار متساوية، وأن تكون حبيبات التربة ما تزال عالقةً عليها. ويؤخذ في ذات الوقت عينة من التربة لتقدير رطوبتها.

٢- توضع الجذور في حوجلة سعة ٢٥٠ مل تحوي ١٠٠مل من ماء تم تعقيمه ثم تُرجّ الحوجلة مدة ٢ دقيقة.

٣- تُنشل الجذور من الحوجلة الأولى بواسطة ملقط معقم لتنقل بشكل متتابع إلى ست حوجلات أخرى سعة ٢٥٠ مل تحوي كل منها على ١٠٠مل ماء معقماً. ويتم رج كل حوجلة بعد وضع الجذور فيها مدة ٢ دقيقة، ويفضّل وضع ٣-٥ غ من الرمل في الحوجلة السابعة قبل تعقيمها.

٤- يؤخذ من كل حوجلة بواسطة ماصة معقمة كمية ٠.٠٥ مل (يجب استخدام ماصة جديدة ومعقمة لكل حوجلة) لتزرع على بيئة الآجار المغذي وتنشر الكمية بواسطة ماسحة معقمة.

٥- توضع الأطباق بشكل مقلوب في حاضنة عند درجة حرارة ٢٨- ٣٠ م لمدة ٣-٥ أيام.

ملاحظات :

أ- يلاحظ بعد التحضين أنه كلما زاد غسيل الجذور في الحوجلات بصورة متتابعة لا ينخفض تعداد البكتريا، لا بل على العكس فإنه في كثير من الحالات قد يرتفع التعداد.

ب- تظهر في الأطباق المزروعة من الحوجلات الأولى مستعمرات لبكتريا متبوغة تابعة للجنس *Bacillus*. وكلما زاد غسيل الجذور انخفض تعداد البكتريا المتبوغة على حساب زيادة تعداد البكتريا غير المتبوغة التابعة للجنس *Pseudomonas* والـ *Mycobacteria* حيث تأخذ مستعمرات الأخيرة على الأغلب اللون الأصفر أو البرتقالي .

٦- لتقدير أعداد الكائنات الحية الدقيقة في منطقة الريزوسفير و على سطوح الجذور ترج الحوجلة الأولى مدة ٥ دقائق إضافية. ليُعمل منها تخفيفات متتالية. يؤخذ من التخفيفات المناسبة ٠.٠٥ مل (من كل تخفيف) وتزرع على أوساط مغذية يتم اختيارها حسب الهدف من الدراسة.

٧- يتم مزج محتويات الحوجلات الستة المتبقية في حوجلة واحدة ليعمل منها أيضاً تخفيفات متتالية وليؤخذ من التخفيفات المناسبة ٠.٠٥ مل (من كل تخفيف) وتزرع على بيئات غذائية يتم اختيارها حسب الهدف من الدراسة.

٨- تحسب النتائج على النحو التالي:

أ- لتقدير تعداد الكائنات الحية الدقيقة في ١ غ تربة جافة تماماً للمجموعة الميكروبية المدروسة؛ يتم أخذ متوسط عدد المستعمرات النامية في أطباق بتري التابعة للتخفيف المدروس، ثم يُضرب المتوسط بالرقم ٢٠ (وذلك لتقدير عدد الميكروبات في ١ مل) ثم بمقلوب التخفيف، ويُقَسَّم الناتج على وزن تربة الريزوسفير الجافة تماماً.

تقدر كمية التربة الموجودة في منطقة الريزوسفير في الحوجلة الأولى من خلال معرفة الفرق بين وزن العينة الابتدائية (أي تلك التي تم أخذها عند بداية إجراء الاختبار) ووزن عينة الجذور. ولتقدير وزن الجذور يتم انتشالها من الحوجلة بواسطة ملقط ثم توضع على ورق ترشيح للتخلص من رطوبتها وبعد ذلك يتم وزنها.

ب- لحساب عدد الكائنات الحية الدقيقة للمجموعة الميكروبية المدروسة في ١ غ من الجذور؛ يُضرب متوسط عدد المستعمرات النامية في طبق بتري للتخفيف المدروس بالرقم ٢٠ ثم بمقلوب التخفيف ثم يُقَسّم الناتج على وزن الجذور.

الفصـل الحادي عشر
الاختبارات الميكروبيولوجية للمياه والحليب والحبوب

الفحص الميكروبيولوجي للمياه

الأحياء الدقيقة الموجودة في المياه متنوعة للغاية. ويتأثر عددها ونوعها بكمية المادة العضوية الموجودة في المياه، وبالظروف البيئية المحيطية مثل: pH الوسط ودرجة الحرارة والتهوية، وكذلك بوجود المواد السامة وغيرها.

يتم الفحص الميكروبيولوجي للمياه للتاكد من خلوّه من براز الإنسان والحيوان، الذي يمكن أن يحمل معه الكثير من الأمراض الخطيرة، مثل :

الحمى التيفية Typhoid fever والكوليرا Cholera والزحار Bacillory dysentery .

علاوة على البكتريا الممرضة Pathogens يمكن أيضاً أن يوجد في المياه أحياء دقيقة:ذاتية التغذية Autotrophs، ورميّة غير ذاتية التغذية Saprophytic heterotrophs.

توجد البكتريا الكولونية (القولونية) Coliform بشكل طبيعي في أمعاء الإنسان والحيوان. ووجودها في المياه بحدّ ذاتها غير ممرض، إلا أنه يُعدّ مؤشراً على تلوث المياه بالبراز. وهذه المجموعة (أي الـ Coliform) يجب أن لا توجد في الأحوال الطبيعية في المياه .

يُقصد بالبكتريا القولونية Coliform في هذا الفصل هما النوعان :

. *Enterobacter aerogenes , Escherichia coli*

تمتاز البكتريا الكولونية بأنها : لا هوائية اختيارياً وقادرة على تخمير اللاكتوز ومنتجة للغاز وهي سالبة الغرام وغير متبوّغة.

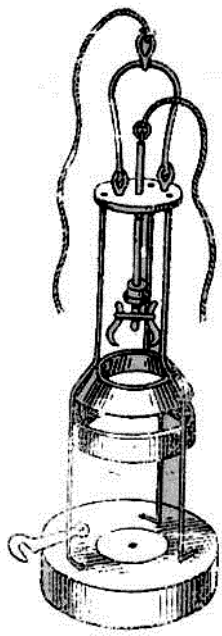
الفحص الميكروبيولوجي للمياه

يجرى الفحص الميكروبيولوجي للمياه لمعرفة مدى صلاحيته للاستخدام المنزلي أو للشرب أو للاستخدام في مجال الصناعات الغذائية .

طريقة أخذ العينة :

تعدّ هذه الخطوة من المراحل الهامة للغاية في أثناء الفحص البكتيري للمياه. ويجب أخذ العينة بصورة صحيحة ، لأن نتائج التحليل يمكن أن تتأثر بمدى الدقة التي تمت فيها هذه الخطوة :

- **طريقة أخذ العينة من المياه السطحية والجوفية:** (أنهار، بحيرات ، مسابح ، آبار ..). تؤخذ عينة المياه بواسطة جهاز خاص (الشكل-٦٦)،



(الشكل-٦٦)جهاز لأخذ عينة المياه

هو عبارة عن هيكل معدني مزوّد بقاعدة رصاصيّة ثقيلة وبداخلة قارورة معقمة. يُغطّس الجهاز إلى العمق المطلوب، وتُفتح القارورة بشدّ الحبل المربوط بغطائها.

وبعد أن يتم تعبئة القارورة ، يُرفع الجهاز إلى الأعلى وتُغلق فوهّة القارورة بغطاء معقم .

يجب مراعاة القواعد التالية عند أخذ العينة :

١- في حال أخذت العينة من مصدر ملوث، يؤخذ ثلاث عينات .

العينة الأولى : من أعلى المصدر الملوث، والثانية : من أمامه، والثالثة : من أسفله .

٢- تؤخذ العينات من الآبار بوقتين: صباحاً ومساءً.

٣- تؤخذ عينات المياه من الأنهار والبحيرات والبرك على عمق (٠.٥-١) متر ومن مسافة (١-٢) متر عن الشاطئ أو الضفة .

- **طريقة أخذ العينة من الصنبور :**

١- يُترك الصنبور مفتوحاً لمدة (١٠-١٥) دقيقة لتخرج منه المياه، ثم يُغلق .

٢- تُعقم فوّهة الصنبور باللهب ، وتُصب المياه بلطف في قارورة معقمة مزوّدة بغطاء قطني معقم .

يجب أن تزوّد كل عينة بلصاقة (وثيقة) مرافقة، تحتوي على المعلومات التالية:

- اسم مصدر المياه وموقعه.
- تاريخ أخذ العينة (سنة، شهر، يوم، ساعة) .
- مكان أخذ العينة (الموقع، العمق، البعد عن الضفة ....) .
- معلومات مناخية : درجة الحرارة، الامطار، الرطوبة ....
- الهدف من دراسة العينة.

يتم تحليل العينات بعد فترة زمنية لا تزيد عن (٢) ساعة من وقت أخذ العينة (ويفضل بعد أخذ العينة مباشرة). ويمكن أن تزيد هذه المدة لتصل إلى (٦) ساعات عندها يجب حفظ العينات بدرجة حرارة تتراوح من (١-٥)مْ .

في أثناء التحليل الميكروبيولوجي للمياه يجرى عادة :

أولاً– تحديد التعداد العام للأحياء الدقيقة (الاختبار الكمي) Quantitative test.

ثانياً– الكشف عن البكتريا الدالة على التلوث أي على مجموعة الكوليفورم Coliform (الاختبار النوعي) Qualitative tests:

أولاً –تحديد التعداد العام للأحياء الدقيقة (الاختبار الكمي) Quantitative Test:

من الصعوبات التي يمكن مواجهتها في أثناء تحديد التعداد العام للكائنات الدقيقة في المياه، التنوع الكبير للأحياء الدقيقة وبالتالي اختلاف احتياجاتها الفيزيولوجية. ولا يوجد وسط مغذّ واحد، أو pH محددة، أو درجة حرارة ثابتة مناسبة لجميع أنواع الكائنات الدقيقة في المياه، ولهذا فإن عدداً قليلاً من الكائنات الدقيقة في أثناء الفحص بهذه الطريقة سوف يظهر على أي من الأوساط المغذية المستخدمة.

على العموم، إن معرفة التعداد العام للكائنات الدقيقة في الماء يمكن أن يعطي تصوراً مفيداً خصوصاً عند التعرف على الحالة الميكروبيولوجية للمياه قبل وبعد حفظه

(تخزينه). كما يعطي هذا الاختبار أيضاً تصوراً عن مستوى وفعالية المراحل المختلفة المتبعة في أثناء تنقية المياه Purification of water .

– تحديد التعداد العام للأحياء الدقيقة في المياه بطريقة الأطباق المصبوبة Plate count: وهنا لا بد من التوقف أمام حالتين اثنتين:

أ– في حال توقع احتواء عينة المياه على كمية متدنية من البكتريا. كالفحص الميكروبيولوجي لمياه الصنبور (الشبكة العامة للمياه). يتم اتباع الطريقة التالية:

المواد والأدوات اللازمة :

- ممص معقم سعة (١) مل عدد (١) .
- وسط آجار التريبتون والغلوكوز Tryptone Glucose Extract Agar (TGEA) الذي يتكون من(غ): بيبتون–٥، مستخلص اللحم–٣، غلوكوز–١، آجار–١٥ وماء مقطر ١٠٠٠مل.
- (٣) أطباق بتري معقمة.
- عينة المياه المراد اختبارها.

الطريقة :

١- يسال وسط آجار التريبتون والغلوكوز (TGEA) ويُنتَظَر حتى تنخفض حرارته إلى (٤٥)مْ.

٢- تُرج العينة المراد اختبارها (٢٥) مرة، وينقل بواسطة ماصة معقمة (١) مل من الماء إلى كل طبق (٣ أطباق).

٣- يصب الوسط المغذي فوق عينة المياه الموجودة في أطباق بتري. ويُمزج مع العينة بشكل جيد وذلك بتحريك الطبق حركة رحوية بسيطة على سطحٍ مستوٍ.

٤- تحضّن الأطباق مقلوبة عند (٣٥)مْ لمدة (٢٤) ساعة.

٥- تعدّ المستعمرات في الأطباق الثلاث ويؤخذ المتوسط الحسابي لها فنكون بذلك قد حصلنا على عدد البكتريا في (١) مل .

ب- في حال توقع احتواء عينة المياه على كمية كبيرة من البكتريا (المياه السطحية). يتم الفحص الميكروبيولوجي بالطريقة التالية:

المواد والأدوات اللازمة:

وسط غذائي TGEA ، ممصات معقمة سعة (١) مل، (١٢) طبق بتري معقمة، أنابيب اختبار تحوي (٩) مل ماء معقم عدد (٤)، عينة المياه المراد اختبارها.

الطريقة :

١- يُسال الوسط المغذي TGEA ويُنتظر حتى تنخفض درجة حرارته إلى (٤٥) م.

٢- تُرجّ العينة المراد اختبارها (٢٥) مرة. وتجهز التخفيفات التالية:

$$\frac{1}{10,000}, \frac{1}{1000}, \frac{1}{100}, \frac{1}{10}$$.

٣- يؤخذ بواسطة ماصة معقمة (١) مل من كل تخفيف ليوضع في (٣) أطباق بتري. ولا ننسى كتابة أرقام التخفيفات الموافقة على سطح الأطباق.

٤- تصب في أطباق بتري وسط TGEA. وتُخلط محتويات الأطباق مع الوسط بتحريك كل طبق حركة رحوية بسيطة على سطحٍ مستوٍ.

٥- تحضّن الأطباق مقلوبة عند (٣٥)مْ لمدة (٢٤) ساعة.

٦- تُختار الأطباق التي احتوت بين (٣٠-٣٠٠) مستعمرة. ويُحسب المتوسط الحسابي للمستعمرات التابعة لكل تخفيف.

٧- يحسب عدد البكتريا الموجودة في (١) مل وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات التابعة للتخفيف المختار بمقلوب نفس التخفيف.

يمكن تسجيل النتائج حسب الجدول التالي:

العينة	المصدر	متوسط عدد المستعمرات في الأطباق	التخفيف	عدد الكائنات في (١) مل
A				
B				
C				

ثانياً – الكشف عن البكتريا الدالة على التلوث أي مجموعة الكوليفورم Coliform (الاختبار النوعي) Qualitative teste .

تجرى ثلاثة اختبارات للتحري عن مجموعة الكوليفورم Coliform. وكل اختبار يؤكد أو يدحض واحدة أو أكثر من خواص مجموعة الكوليفورم والاختبارات هي

أ – الاختبار الاحتمالي Presumptive test

ب – الاختبار التأكيدي Comfirmed test

حـ – الاختبار المتمم Completed test

أ – الاختبار الاحتمالي : Presumptive Test

يمكن التأكد في هذا الاختبار من وجود أو عدم وجود خاصية تخمير اللاكتوز للكائنات المحتواة في عينة المياه المدروسة. حيث يتم الاستفادة من قدرة البكتريا الكولونية (القولونية) Coliform bacteria على تحلل اللاكتوز بمساعدة أنزيم بيتا غالاكتوزيداز.

يتم إجراء الاختبار الاحتمالي بأخذ مجموعة من أنابيب الاختبار (٩-١٢) أنبوب تحتوي على مرق اللاكتوز وتُلقح بكمية محددة من عينة المياه وذلك للكشف عن احتواء المياه لبكتريا قادرة على تخمير اللاكتوز وإنتاج الغاز. في حال ظهور الغاز في أيٍّ من أنابيب الاختبار الحاوية على مرق اللاكتوز، فهذا دليل على احتمال وجود البكتريا الكولونية (القولونية) في عينة المياه المختبرة.

علاوة على ذلك يستخدم هذا الاختبار من أجل حساب العدد الأرجح Most Proboble Number (MPN) من بكتريا الكوليفورم Coliform الموجودة في (١٠٠) مل من الماء. وهنا يمكن التوقف أمام حالتين اثنتين:

أ–١– في حال توقع احتواء عينة المياه المختبرة على أعداد قليلة من الكائنات الدقيقة . يتم إجراء الاختبار الاحتمالي كالتالي :

المواد والأدوات اللازمة :

– (٣) أنابيب اختبار تحوي وسط مرق اللاكتوز بتركيز مضاعف*
Double Strength Lactose Broth (DSLB)
كما تحوي بداخلها أنابيب درهام لتجميع الغاز المنطلق أثناء التخمر .

– (٦) أنابيب اختبار تحوي وسط مرق اللاكتوز غير المضاعف Single Strength Lactose Broth (SSLB) تحوي بداخلها أنابيب درهام.

يتكون وسط مرق اللاكتوز من (غ): ببتون –٥ , مستخلص اللحم Beef meat extract–٣ ، لاكتوز –٥ , وماء مقطر ١٠٠٠مل .

– ممص معقم سعة (١٠) مل عدد (١)

– ممص مدرج معقم سعة (١) مل عدد (١) .

الطريقة :

١- تُرجّ عينة المياه بشكل جيد (٢٥) مرة .

٢- يُزرع (١٠) مل من عينة المياه بواسطة ماصة معقمة سعة (١٠) مل في أنابيب الاختبار الثلاث الأولى التي تحوي وسط مرق اللاكتوز ذا التركيز المضاعف (DSLB) (المجموعة الأولى من الأنابيب) .

٣- ينقل (١) مل من عينة المياه بواسطة ماصة معقمة سعة (١) مل ليزرع في (٣) أنابيب اختبار تحوي على وسط مرق اللاكتوز غير المضاعف (SSLB) (المجموعة الثانية من الأنابيب) .

٤- ينقل بواسطة ماصة مدرجة سعة (١) مل مقدار (0,1) مل من عينة المياه لتزرع في أنابيب الاختبار الثلاثة المتبقية التي تحوي على وسط مرق اللاكتوز غير المضاعف (SSLB) (المجموعة الثالثة من الأنابيب).

٥- تُحضَّن الأنابيب عند (٣٥)مْ لمدة (٢٤) ساعة.

*** يجب أن يكون تركيز الوسط المغذي عالياً بحيث لا يهبط عن مستوى مرق اللاكتوز القياسي عند إضافة الماء المراد فحصه .**

النتيجة :

أ – في حال عدم ظهور الغاز في الأنابيب تحضَّن الأخيرة ثانية لمدة ٢٤ ساعة أخرى.

ب– في حال ظهور الغاز في أيٍّ من الأنابيب بنسبة ١٠% وما فوق ، يتم متابعة التحليل بإجراء الاختبارات اللاحقة للتأكد من أن الغاز الناتج جاء نتيجة وجود مجموعة بكتريا الكوليفورم ليس إلا.

حـ – عند عدم ظهور الغاز في الأنابيب المحضَّنة ثانية (الفقرة–أ) بعد (٤٨) ساعة، فهذا دليل على سلبية الاختبار، وصلاحية الماء بكتيريولوجيا للشرب، أو للاستخدام المنزلي أو الصناعي الغذائي.

ء – في حال ظهور الغاز في الانابيب المحضَّنة ثانية (الفقرة آ) بعد (٤٨) ساعة فهذا دليل على احتمال وجود بكتريا الكلوليفورم، ويتم متابعة التحليل بإجراء الاختبارات اللاحقة. (الاختبار التأكيدي والاختبار المتمم).

هـ – يُحسب العدد الأرجح Most Proboble Number (MPN) باستخدام جداول خاصة (انظر الجدول–٣) وذلك بعد التأكد من خلال الاختبارات اللاحقة، بأن العينة المختبرة تحتوي بكتريا تتبع لمجموعة الكوليفورم.

(جدول –٤) تقدير العدد الأرجح (MPN) من اختبار الأنابيب المتعددة

عدد الأنابيب التي أعطت تفاعلاً إيجابياً			العدد الأرجح	٩٥ % حدود الثقة	
١٠ مل	١ مل	٠.١ مل	لكل ١٠٠ مل	الحد الأدنى	الحد الأعلى
0	0	1	3	< 0.5	9
0	1	0	3	< 0.5	13
1	0	0	4	< 0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800

الجدول مأخوذ من:

From: *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Twelfth edition (New York: The American Public Health Association, Inc. , p. 608)

مثال عن كيفية حساب العدد الأرجح Most Proboble Number:

تبيّن في أثناء فحص عينة المياه عن طريق إجراء الاختبار الاحتمالي ظهور الغاز في كل مجموعة أنابيب الاختبار الأولى. وظهور الغاز فقط في أنبوب اختبار واحد من مجموعة أنابيب الاختبار الثانية، ولم يكن هناك وجود للغاز في مجموعة أنابيب الاختبار الثالثة، هذا يعني أن قراءة الاختبار ستكون (310)، وحسب الجدول (٣) فإن العدد

الأرجح سيكون (٤٣). ويجب ألا يغيب عن البال أن العدد الأرجح المحسوب بهذه الطريقة هو فقط رقم إحصائي احتمالي Statistical probability figure .

أ–٢– في حال توقع احتواء عينة المياه المختبرة أعداداً كثيرة من الكائنات الدقيقة كما هو الحال في المياه السطحية العكرة Turbid Surface water . عندها يتم إجراء الاختبار الاحتمالي على النحو التالي :

المواد والأدوات اللازمة :

- (٣) أنابيب اختبار تحوي على وسط مرق اللاكتوز ذي التركيز المضاعف Double Strength Lactose Broth (DSLB) . و بداخلها أنابيب درهام.
- (٩) أنابيب اختبار تحوي على وسط مرق اللاكتوز ذي التركيز العادي Single Strength Lactose Broth (SSLB) و بداخلها أنابيب درهام.
- ماصة سعة (١٠) مل عدد (١) معقمة.
- ماصة سعة (١) مل عدد (٢) معقمة ومدرجة.
- حوجلة زجاجية تحتوي على (٩٩) مل ماء معقم.

الطريقة :

١- ترج عينة المياه (٢٥)مرة.

٢- بواسطة ماصة معقمة سعة (١٠) مل ينقل (١٠) مل من الماء إلى أنابيب الاختبار الثلاثة الحاوية على (DSLB) (المجموعة الأولى من الأنابيب).

٣- بواسطة ماصة معقمة مدرجة سعة (١) مل ينقل (١) مل من عينة المياه إلى ثلاثة أنابيب اختبار المحتوية على (SSLB) (المجموعة الثانية من الأنابيب).

٤- بواسطة ماصة معقمة ومدرجة سعة (١) مل ينقل (٠.١) مل من عينة المياه إلى ثلاثة أنابيب اختبار المحتوية على (SSLB) (المجموعة الثالثة من الأنابيب).

٥- بواسطة ماصة معقمة سعة (١) مل ينقل (١) مل من العينة الابتدائية لينقل إلى حوجلة سعة (٩٩) مل ماء معقم. تُرجّ الحوجلة (المنقول إليها ١ مل) بشكل جيد (٢٥) مرّة.

٦- بواسطة ماصة معقمة سعة (١) مل ينقل (١) مل من ماء الحوجلة إلى أنابيب الاختبار الثلاثة المتبقيّة الحاوية على SSLB (المجموعة الرابعة من الأنابيب).

٧- تحضّن الأنابيب عند (٣٥)مْ لمدة (٢٤)ساعة.

النتيجة:

أ - تُفحص الأنابيب وتُسجل أرقام الأنابيب التي ظهر فيها غاز بنسبة (١٠%) وما فوق.

ب- في حال عدم ظهور الغاز في الأنابيب بعد (٢٤) ساعة من التحضين، يُصار إلى تحضين الأنابيب ثانية لمدة (٢٤) ساعة أخرى، فإن استمر عدم ظهور الغاز في الأنابيب، اعتُبر الاختبار سلبياً.وكانت عينة المياه خالية من البكتريا الكولونية (القولونية) .

جـ- عند ظهور الغاز في الأنابيب يُتابع التحليل لإجراء الاختبارات اللاحقة. ويُحسب العدد الأرجح MPN، بالاعتماد على الجدول رقم (٣). بيد أن هذا الجدول صُمِّم على أساس استخدام (٩) أنابيب اختبار فقط وليس (١٢) أنبوباً. في الحالة الأخيرة يُتّبع عند حساب العدد الأرجح ما يلي :

- تُختار تلك المجموعات من الأنابيب التي ظهر فيها الغاز، ولم يعقبها ظهور الغاز في الأنابيب اللاحقة (انظر المثال ٢).
- عند عدم استخدام المجموعة الأولى من الأنابيب (أي الأنابيب الملقحة بـ ١٠ مل من عينة المياه) في القراءة. يُضرب العدد الأرجح بالرقم (١٠) .

مثال (١) :

ظهر في المجموعة الأولى (٣) أنابيب تحتوي على غاز، وظهر في المجموعة الثانية أيضاً (٣) أنابيب تحتوي على غاز، وكذلك في المجموعة الثالثة. أما في المجموعة الرابعة فظهر الغاز فقط في أنبوب اختبار واحد. فتكون القراءة ٣٣٣١. في هذه الحالة تُهمل مجموعة الأنابيب الأولى وتصبح القراءة ٣٣١. وهذه تعادل حسب الجدول (٤٦٠). وباعتبار أن المجموعة الأولى من الأنابيب قد أُهْملت يُضْرَب الرقم (٤٦٠) بـ (١٠) فيكون العدد الأرجح مساوياً (٤٦٠٠).

مثال (٢) :

في حال كانت قراءة الأنابيب 3220، يُلاحظ هنا أن المجموعات الثلاث الأولى من الأنابيب قد ظهر فيها الغاز، أما المجموعة الرابعة من الأنابيب فكانت خالية من الغاز، عندها يؤخذ بعين الاعتبار تلك المجموعات من الأنابيب التي ظهر فيها الغاز ولم يعقبها ظهور الغاز فتكون القراءة 322. ويكون العدد الأرجح MPN حسب الجدول مساوياً (٢١٠) خلية. **يمكن جدولة نتائج الاختبار الاحتمالي على النحو التالي:**

عينة المياه	مجموعات الأنابيب				(العدد الأرجح) MPN
(المصدر)	٣ أنابيب DSLB زُرِعت بـ ١٠ مل	٣ أنابيب SSLB زُرِعت بـ ١ مل	٣ أنابيب SSLB زُرِعت بـ ٠.١ مل	٣ أنابيب SSLB زُرِعت بـ ٠.٠١	
A					
B					
C					
D					

ب – الاختبار التأكيدي The confirmed Test :

من الممكن أن تنتج الغاز أيضاً بكتريا لا تتبع للمجموعة الكولونية مثل *Clostridium perfringens*، وهي بكتريا عصوية، موجبة لغرام. وللتأكد من أن إنتاج الغاز كان سببه فقط البكتريا الكولونية، يجب متابعة التحليل بإجراء الاختبار التأكيدي. ويتم هذا الاختبار عادة باستخدام الوسطين المغذيين التاليتين: إيوزين زرقة الميثلين Eosine Methylen Blue (*E.M.B*) ووسط إندو آجار *Endo Agar*. يعمل هذان الوسطان على إعاقة نمو البكتريا موجبة الغرام كما يستخدم الوسطان للتفريق بين مستعمرات بكتريا مجموعة الكوليفورم عن غيرها من البكتريا.

يعوق الوسط المغذي *E.M.B* نمو البكتريا موجبة غرام بسبب احتوائه على أزرق الميثلين. على حين يسمح للبكتريا السالبة لغرام والمخمّرة لسكر اللاكتوز (أي مجموعة الكوليفورم) بالنمو. فتبدو الأخيرة على هذا الوسط على شكل مستعمرات ذات مركز معتم أو أسود. والتفريق بين *E.coli* و *E.aerogenes* يقوم على أساس حجم

مستعمرات كلا النوعين، ووجود أو عدم وجود لمعان معدني ضارب إلى الخضرة Greenish metallic shen؛ حيث تبدو مستعمرات *E.coli* على هذا الوسط صغيرة وذوات لمعان معدني. في حين أن *E.aerogenes* تكون عادة أكبر وبدون لمعان معدني.

تبدو مستعمرات بكتريا مجموعة الكوليفورم والمناطق المحيطة بها على وسط *Endo Agar* حمراء اللون. أما البكتريا الأخرى غير القادرة على تخمير اللاكتوز فتظهر بدون لون ولا تؤثر أيضاً هذه البكتريا على لون الوسط .

بالإضافة إلى الوسطين *E.M.B* و *Endo Agar* هناك أوساط مغذية أخرى يمكن استخدامها من أجل الاختبار التأكيدي مثل :

Brilliant green bile lactose broth و Eigkman,s medium و Ecmedium.

المواد والأدوات اللازمة:

- أنابيب من الاختبار الاحتمالي ظهر فيها الغاز .
- وسط إيوزين زرقة الميثلين Eosine Methylen Blue (E.M.B) ووسط إندوآجار.

يتكون وسط (E.M.B) من: بيبتون-١٠غ، لاكتوز-١٠غ، K_2HpO_4 -٢غ، أيوزينY٠.٤غ، أزرق الميتلين٦٥ ملغ، آجار-١٥غ، ماء مقطر ١٠٠٠مل

يتكون وسط إندو آجار من (غ) :ببتون-١٠، لاكتوز-١٠، K_2HpO_4 -٣.٥، كبريت الصوديوم-٢.٥ ، فوكسين قاعدي-٠.٥، آجار-١٥، وماء مقطر ١٠٠٠مل.

- أطباق بتري معقمة وإبرة لاقحة .

الطريقة :

١- يُسال الوسطان الغذائيان *E.M.B* وإندو آجار في حمام مائي عند (١٠٠) ْم. ويُنتظر حتى تنخفض درجة حرارتهما إلى (٤٥)م. وتوزّع في أطباق بتري معقمة.

٢- تُؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة ، عينة من أنبوب اختبار ظهر فيه الغاز في أثناء إجراء الاختبار الاحتمالي .

٣- توزَّع العينة بطريقة التخطيط Streak method على سطح أطباق بتري الحاوية على الوسطين *E.M.B* وإندو آجار .

٤- تحضّن الأطباق مقلوبة عند (٣٥)مْ خلال (٢٤) ساعة .

النتيجة :

آ- يتم التحري عن المستعمرات التي تتميّز بالمواصفات المزرعيّة للبكتريا الكولونية التي تحدثنا عنها آنفاً .

ب- إذا لم يكن هناك وجود لمستعمرات بكتريا مجموعة الكوليفورم، فمعنى ذلك أن الاختبار سلبي، وأن المياه صالحة للشرب بكتيريولوجياً.

حـ- عند وجود مستعمرات لبكتريا مجموعة الكوليفورم، يتم متابعة التحليل بإجراء الاختبار المتمم.

ملاحظة :

من الناحية العملية. فإن التأكد من جميع أنابيب الاختبار الاحتمالي (سواء تلك التي ظهر فيها الغاز أم التي لم تظهر) أمر ضروري لضمان صحة النتائج.

يمكن وضع نتائج الاختبار التأكيدي حسب الجدول التالي:

عينة المياه (المصدر)	إيجابي	سلبي
A		
B		
C		
D		

حـ – الاختبار المتمم Completed Test:

يتم في هذا الاختبار التأكد النهائي من أن المستعمرات التي ظهرت على الأوساط المغذية المستخدمة في الاختبار التأكيدي، ما هي إلا عبارة عن مستعمرات تتبع للمجموعة الكولونية، أي أنها تتصف بكل خواص مجموعة الكوليفورم التي هي: القدرة على تخمير اللاكتوز و سالبة لغرام، وغير متبوغة وعصوية قصيرة. ويتم اختبار ذلك عن طريق إجراء الفحص المجهري للمستعمرات المعزولة وزرعها على وسط مرق اللاكتوز لمدة (٢٤) ساعة عند (٣٥)م .

المواد والأدوات اللازمة:

- وسط مرق اللاكتوز موزَّع في أنابيب تحتوي على أنابيب درهام .
- أنابيب اختبار الآجار المغذي المائل Nutrient agar slant .
- كل ما يلزم للفحص المجهري والصبغ بطريقة غرام .
- أطباق بتري تحتوي على مستعمرات نامية على البيئتين *E.M.B* و *Endo Agar*.

(مأخوذة من الاختبار التأكيدي).

الطريقة :

١- تؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة المعقمة والمبرّدة، عينة من المستعمرات النامية على وسط *EMB* ووسط إندو آجار، وتُزرع في أنابيب اختبار تحتوي وسط مرق اللاكتوز.

٢- يؤخذ بواسطة الإبرة اللاقحة عينة من المستعمرات النامية على وسط *EMB* وإندو آجار، وتُزرع في أنابيب الآجار المغذي المائل .

٣- تحضّن الأنابيب عند (٣٧)مْ لمدة (٢٤) ساعة .

٤- يجهز محضر الخلايا المثبتة ويصبغ بطريقة غرام (تؤخذ العينة من المزارع النامية في أنابيب الآجار المغذي المائل) .

النتيجة :

أ- يُسَجّل ظهور الغاز من عدمه في أنابيب الاختبار الحاوية وسط مرق اللاكتوز.

ب- عند ظهور الغاز في أنابيب مرق اللاكتوز (أي أن البكتريا المفحوصة مخمِّرة للاكتوز) وكانت البكتريا المشاهدة تحت المجهر سالبة لغرام، غير متبوّغة، وعصوية، وقصيرة، فهذا دليل على إيجابية الاختبار، وأن العينة المدروسة تحتوي بكتريا تابعة لمجموعة الكوليفورم.

للتفريق بين النوعين *E.coli* و *E.arogenes*. يتم إجراء عدة اختبارات هي:

١- اختبار الأندول Indol Test .

٢- اختبار حمرة الميتيل Methyl Red Test .

٣- اختبار فوغر – بروسكاوير Voges-Proskauar Reaction Test .

٤- اختبار تمثيل السترات Citrateutilization Test ويُرمز عادة لهذه الاختبارات الأربعة باختصار IMVIC. وقد تم شرحها مفصلاً في الفصل التاسع .

يمكن وضع نتائج الاختبار المتمم حسب الجدول التالي:

عينة المياه (المصدر)	نتيجة تخمر اللاكتوز	الفحص المجهري	التقييم

الفحص البكتيري للمياه باستعمال أغشية الترشيح Membrane filter methed:

تتلخص هذه الطريقة، بوضع غشاء ترشيح معقم في المكان المناسب من وحدة الترشيح المستخدمة ثم تمرير عينة المياه من خلال الغشاء، عند ذلك يتم حجز الأحياء الدقيقة على سطح الغشاء الذي يُنقل ليوضع فوق وسط مغذٍ مناسب، موزّعٍ مسبقاً في أطباق بتري. ثم يجري تحضين الأطباق عند درجة حرارة مناسبة. ويتم بعد ذلك إجراء الاختبارات اللازمة (الشكل-٦٧).

ولهذه الطريقة ميزات عدة منها:

- تُمَكّن من فحص عينات كثيرة من المياه .
- الحصول على نتائج أسرع بالمقارنة مع الطريقة السابقة .
- سهولة عدّ المستعمرات النامية على أغشية الترشيح .
- يمكن نقل أغشية الترشيح من وسط مغذٍ إلى أخرى وذلك للتفريق بين البكتريا.

الأدوات والمواد اللازمة:

- **وحدة الترشيح Membrane filtering unit** المكوّنة من :

- حامل غشاء الترشيح filter holder: المصنوع من الفولاذ أو الزجاج أو الخزف.
- دورق الترشيح: مزوّد بفتحة جانبية تتصل من خلال أنبوب بمضخة تخلية. يُثَبَّت حامل غشاء الترشيح على دورق الترشيح . (انظر مرشحة زايتس)

يتم تعقيم وحدات الترشيح في الصاد الموصد عند (١٢١) مْ لمدة (٢٠) دقيقة وذلك بعد تغليف حامل غشاء الترشيح بالورق، وبعد وضع سدادة قطنية في فوّهة دورق الترشيح وفي الفتحة الجانبية. كما يمكن أن يُعقم حامل غشاء الترشيح بطريقة التلهيب، بعد مسحه مسبقاً بقطعة من القطن مشبعة بالكحول. ويجب أن يُحفظ حامل غشاء الترشيح ودورق الترشيح في ظروف معقمة لحين الاستعمال.

– أغشية ترشيح معقمة: Sterile membran filter disks: تعقّم هذه الأغشية قبل الاستعمال، بوضعها في أطباق بتري التي تغلّف بورق مناسب. ثم توضع بالصاد الموصد مدة (١٠) دقائق بدرجة (١٢١)مْ. علماً أنه توجد في الأسواق أغشية ترشيح معقمة. وبديهي أن تكون أقطار ثقوب أغشية الترشيح أصغر من أبعاد البكتريا.

– **وسائد امتصاص معقمة Absorbent pad** : و هي عبارة عن أقراص من ورق الترشيح أو مادة أخرى. تعقم وسائد الامتصاص بنفس الطريقة التي تعقم فيها أغشية الترشيح.

– **بيئات غذائية مناسبة:** مثل وسط آجار أيوزين زرقة الميثلين Eoisine Methylene blue (E.M.B) إندوآجار EndoAgar.

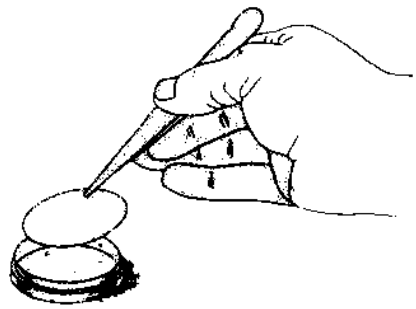
– ملقط معقم – ممصات معقمة ، ماء معقم .

– أطباق بتري بلاستيكية ذوات أقطار (٥)سم .

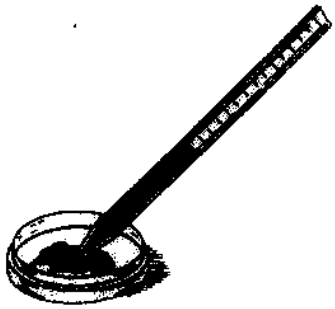
الطريقة:

١– في البداية لا بد من اختيار الحجم المناسب للعينة المدروسة وتتوقف كمية المياه الواجب ترشيحها على عدد البكتريا المحتمل وجودها في العينة. وبدهي أنه كلما كان احتمال وجود أعداد كثيرة من البكتريا، كانت الكمية الواجب ترشيحها أقل والعكس صحيح . ويُنصح بإجراء الفحوص للعينات المدروسة من مصادر مختلفة على النحو التالي:

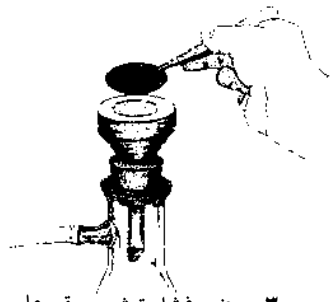
أ – المياه المعالجة : يتم ترشيح عينتين كل منها بحجم (١٠٠-٥٠٠) مل.



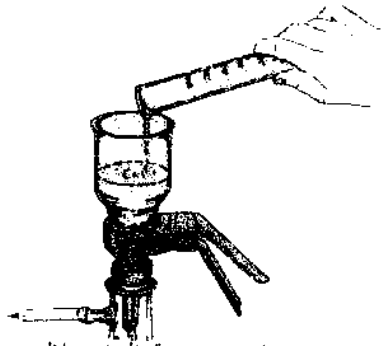
١- نقل وسادة الامتصاص بملقط معقم إلى قعر طبق بتري بلاستيكي معقم



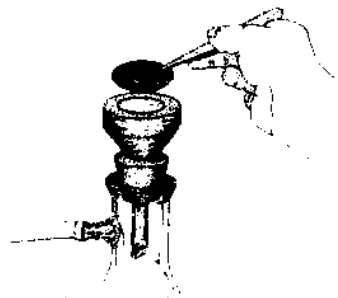
٢- إضافة ٢ مل في وسط إندو آجار إلى وسادة الامتصاص



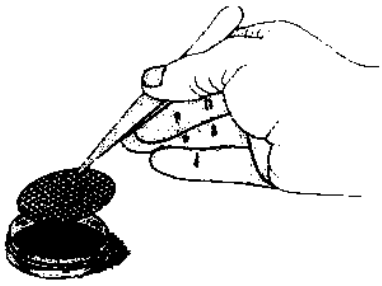
٣- وضع غشاء ترشيح معقم على حامل غشاء الترشيح



٤- صب عينة المياه خلال وحدة الترشيح، عن طريق إحداث تفريغ



٥- نقل غشاء الترشيح بملقط معقم بعد عملية الترشيح



٦- وضع غشاء الترشيح فوق الوسط المغذي ثم التحضين عند (٣٥)مْ لمدة (٢٤) ساعة

(الشكل-٦٧) خطوات الفحص الميكروبيولوجي للمياه بطريقة الترشيح .

ب- *مياه الآبار :* يتم ترشيح عينة واحدة لكل من الحجوم (٠.١) مل و (١) مل و (١٠) مل.

حـ – *مياه ملوثة :* تمدد الحجوم حسب درجة التلوث المتوقع . ففي حال كان حجم الماء المراد ترشيحه أقل من (٢٠) مل يمدد قبل الترشيح مباشرة بواسطة الماء المعقم .

٢- توضع وسادة الامتصاص المعقمة في كل طبق، وتُصب كمية من الوسط (١.٨-٢.٢) مل في كل طبق بتري لإشباع وسادة الامتصاص.

٣- يؤخذ غشاء الترشيح المعقم بواسطة ملقط معقم ليوضع على الصفحة المسامية لحامل وحدة الترشيح. بحيث تكون شبكة الغشاء نحو الأعلى.

٤- تُوضع وحدة الترشيح فوق دورق الترشيح.

٥- تُسكب العينة المختبرة من الماء من خلال الغشاء مع التفريغ الذي تحدثه مضخة التفريغ.

٦- بعد الانتهاء من ترشيح العينة يُنزع الغشاء من وحدة حامل غشاء الترشيح بواسطة ملقط معقم.ويوضع (بحيث تكون شبكته نحو الأعلى) فوق سطح وسادة الامتصاص التي تحتوي الوسط المغذي المستخدم .

٧- تحضّن الأطباق عند (٣٥ ±٠.٥)مْ لمدة (٢٢-٢٤) ساعة (يجب عدم قلب الأطباق في الحاضنة).

٨- ينقل الغشاء بعد التحضين ويجفف لمدة ساعة واحدة على ورق الترشيح.

٩- يجرى عدّ المستعمرات المتصفة بالخواص الموروفولوجية لمستعمرات الكوليفورم الواردة في الطريقة السابقة (انظر الاختبار التأكيدي).

١٠- يحسب عدد المستعمرات الكوليفورم في كل (١٠٠) مل من العينة وذلك من المعادلة التالية :

$$\text{عدد خلايا الكوليفورم في (١٠٠) مل} = \frac{\text{مستعمرات الكوليفورم المعدودة} \times ١٠٠}{\text{حجم العينة المرَشَّحة}}$$

يمكن جدولة النتائج كما يلي :

العينات	المصدر	عدد مستعمرات الكوليفورم	كمية الماء المرشّحة	عدد بكتريا الكوليفورم في ١٠٠مل
A				
B				
C				

الفحص الميكروبيولوجي للحليب

يُعَّد الحليب مرتعاً خصباً لنمو الكائنات الحية الدقيقة، لأنه يحتوي معظم المواد الغذائية اللازمة لنموها، مثل: الماء والسكريات والمواد الدسمة والمواد الآزوتية والأملاح والفيتامينات وغيرها. والأمراض التي يسببها الحليب الملوّث خطيرة للغاية، حيث يمكن أن يحتوي الحليب على مسببات أمراض : السل والحمى التيفية والكوليرا والزحار وغيرها.

يتلوّث الحليب بالأحياء الدقيقة من مصادر مختلفة أهمها : الحيوان الحلوب ذاته، والقائم على عملية الحلابة، و الأدوات المختلفة، وكذلك في أثناء حفظ، ونقل وتداول الحليب .

طرائق الفحص البكتيري للحليب :

١- فحص الحليب بطريقة الأطباق المصبوبة Plate count method :

بشكل عام إن الأعداد الكثيرة من البكتريا التي تظهر بهذه الطريقة، ***ربما*** تشير إلى وجود مسببات ممرضة في الحليب. من جهة أخرى فإنه من الممكن أن يحتوي الحليب كائنات ممرضة مثل السل وغيرها، في حين أن تعداد البكتريا المحسوبة بهذه الطريقة يقع ضمن الأرقام المقبولة .

المواد :

عينة الحليب، أنابيب اختبار تحوي (9) مل ماء معقم، ماصات سعة (1) مل معقمة. أطباق بتري معقمة ، وسط Tryptone Glucose Extrat Agar(TGEA)

الطريقة :

١- تُرجّ العينة جيداً. وتُعمل التخفيفات المتتالية كالمعتاد من 10^{-1} إلى 10^{-6}. ولا ننسى ضرورة استخدام ماصة معقمة جديدة عند الانتقال من تخفيف إلى آخر. كما يجب ألا يغيب عن البال ضرورة خلط محتويات كل أنبوب بشكل جيد قبل إجراء التخفيف اللاحق .

٢- يُسال الوسط المغذي في حمام مائي عند (100)مْ، ويُنتظر حتى تنخفض درجة حرارته إلى (45-50) ْم .

٣- يُنقل من كل تخفيف (1) مل إلى (3) أطباق بتري كمكررات. ولا ننسى كتابة أرقام التخفيفات الموافقة على أطباق بتري مباشرة .

٤- يُصَب الوسط المغذي في الأطباق. وتُخلط محتويات كل طبق عن طريق تحريك الطبق حركة رحويّة لطيفة على سطحٍ مستوٍ .

٥- تُحَضَّن الأطباق مقلوبةً عند(35)مْ لمدة (24) ساعة. ثم تُعدّ المستعمرات النامية.

٦- يؤخذ بعين الاعتبار تلك الأطباق التي احتوت بين (30-300) مستعمرة.

٧- يُحسب عدد البكتريا في (1) مل وذلك بضرب متوسط عدد المستعمرات التابعة لتخفيف معين بمقلوب التخفيف نفسه.

ملاحظة :

إذا كان من المتوقع أن يكون الحليب ذا نوعية جيدة، يمكن الاكتفاء بإجراء التخفيفات من 10^{-1} إلى 10^{-3} .

٢- العدّ المباشر للبكتريا تحت عدسة المجهر (طريقة بريد) Direct Microscopic count (Breed Count)

عند اتباع طريقة الأطباق المصبوبة لا يمكن إظهار البكتريا المحبة للحرارة المرتفعة Thermophiles ولا البكتريا المحبة للحرارة المنخفضة Psychrophiles، لأن التحضين يتم عند (35)مْ في حين أن طريقة العدّ المباشر يمكن أن تظهر هذه البكتريا. كما تمتاز هذه الطريقة بإمكانية الكشف عن الـ *Leuconostoc* وعن البكتريا السبحيّة Streptococci ، الأمر الذي يدل على التهاب الضرع عند الحيوان. إضافة لذلك فإن هذه الطريقة تسمح بالوقوف على نوعية الحليب خلال وقت قصير. من هنا نجد أن طريقة العد المباشر تحت عدسة المجهر تستخدم على نطاق واسع لاختبار الحليب الخام Raw في محطات استلام الحليب.

المواد والأدوات اللازمة :

شريحة بريد، ماصات سعة (٠.١) مل تسمى ماصات بريد، أزرق الميتلين، كزيلول Xylol؛ كحول إيتيلي (95)%؛ عينات من الحليب (عالي الجودة ومنخفض الجودة) شريحة قياس ميكروميترية.

الطريقة:

١- تُرج العينة (٢٥) مرة .

٢- يُنقل (٠.٠١) مل من الحليب الخام إلى مربع على الشريحة مساحته ١سم٢ ويُنشر ضمن هذه المساحة بالتحديد.

٣- تجفف الشريحة عند درجة حرارة الغرفة. ثم توضع فوق كأس من الماء المغلي (حمام مائي) لمدة (٥) دقائق لتثبيت الأحياء الدقيقة.

٤- تُغسل الشريحة بالكزيلول للتخلص من الدهون.

٥- يتم التخلص من الكزيلول بغسل الشريحة بالكحول الإيتيلي (95)% .

٦- تُغسل الشريحة بالماء للتخلص من الكحول.

٧- تُغمر الشريحة بصبغة أزرق الميتلين لمدة (١٥) ثانية. ثم تُغْسَل بالماء للتخلص من الصبغة الزائدة.

٨- تُعرّض الشريحة للهواء حتى تمام الجفاف .

٩- توضع شريحة القياس الميكروميترية في مسرح المجهر وتفحص عند نفس التكبير الذي سيتم فيه فحص الشريحة (بالغاطسة). تستخدم هذه الشريحة لتحديد قطر حقل الرؤية. وبالتالي حساب مساحة حقل الرؤية أي مساحة الدائرة πr^2 .

١٠- توضع الشريحة التي تحتوي العينة المراد فحصها في مسرح المجهر وتفحص عند نفس التكبير الذي تم فيه تحديد قطر حقل الرؤية (بالعدسة الغاطسة).

تُعدّ الخلايا الموجودة في (٣٠)حقل رؤية ويُحسب المتوسط الحسابي لعدد الخلايا في حقل رؤية واحد.

١١- يُحسب عدد حقول الرؤية الموجودة في (1) سم٢ وذلك بتقسيم مساحة الغشاء (1)سم٢ على مساحة حقل الرؤية الواحد.

١٢- تحسب عدد الخلايا (البكتريا) الموجودة في (0.01) مل والتي تساوي حاصل جداء عدد حقول الرؤية بمتوسط عدد الخلايا في حقل رؤية واحد. وللحصول على عدد البكتريا في (1) مل يُضرب الناتج بالرقم (100) .

٣- إجراء الاختبار الاحتمالي لمجموعة الكوليفوروم في الحليب :

المواد والأدوات اللازمة :

عينة حليب، أنابيب اختبار تحتوي بيئة ماكونكي السائلة موضوع بداخلها أنابيب درهام، ماصات معقمة سعة (1) مل، أنابيب اختبار تحوي (9) مل ماء معقم.

الطريقة:

١- ترج عينة الحليب (٢٥) مرة.

٢- تجرى التخفيفات المتتالية كالمعتاد 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3}.

٣- يُنقل (1) مل من كل تخفيف بواسطة ماصة معقمة سعة (1)مل إلى (٣) أنابيب اختبار تحتوي على بيئة ماكونكي.

٤- تحضّن الأنابيب عند (37)مْ لمدة (24) ساعة.

٥- تفحص الأنابيب. ويتم التحري عن وجود الحمض و الغاز. فإذا لم يظهر الغاز، تُحضَّن الأنابيب ثانية لمدة (24) ساعة أخرى. ويتم تسجيل النتائج بعد التحضين. حيث تعدّ النتيجة سلبية في حال استمرار عدم ظهور الغاز بعد (48) ساعة. أما في حال وجود الغاز و الحمض فهذا دليل على احتمال وجود بكتريا الكوليفوروم. ويمكن إجراء الاختبارات اللاحقة (الاختبار التأكيدي والمتمم) بنفس الطريقة المبينة في الفحص الميكروبيولوجي للمياه.

٤- اختبار إرجاع أزرق الميتلين Rsductase test

يستعمل من أجل إجراء هذا الاختبار صبغة أزرق الميتلين، الأخيرة ذات لون أزرق وهي بحالتها المؤكْسَدة، ولكن عندما ترُجع تُصبح عديمة اللون. ويتوقف زمن إرجاع اللون إلى عدد البكتريا الموجودة في الحليب فكلما كان زمن الإرجاع طويلاً، دلّ ذلك على احتواء الحليب كميات قليلة من البكتريا و العكس صحيح أيضاً. وبالتالي يمكن من خلال ذلك تحديد جودة الحليب .

المواد و الأدوات اللازمة:

أنابيب اختبار معقمة بسدادات مطاطية، حمام مائي مضبوط عند (35)ْم، أزرق الميتلين : 25000) (1ماصات سعة (10) مل وسعة (1) مل عينات من الحليب (منخفض الجودة ، عالي الجودة).

الطريقة :

١- يؤخذ بواسطة ماصة معقمة (10) مل من الحليب المراد فحصه ويوضع في أنبوب اختبار معقم.

٢- بواسطة ماصة سعة (1) مل يؤخذ (1) مل من أزرق الميتلين ليوضع فوق عينة الحليب.

٣- يُسد الأنبوب بإحكام بالسدادة المطاطية المعقمة ، و يُقْلَب رأساً على عقب (٣) مرات.

٤- يوضع الأنبوب في حمام مائي عند (35)ْم بعد أن يُسَجل عليه المصدر. وزمن وضعه في الحمام المائي.

٥- بعد خمس دقائق من التحضين يُقْلَب الأنبوب مرة واحدة وأخيرة رأساً على عقب ليتم المزج.

٦- يُسجل تغيّر اللون كل (٣٠) دقيقة وتُدوّن النتائج على النحو التالي:

- يعتبر الحليب ممتازاً : إذا لم يزل اللون بعد (٨) ساعات.
- يعتبر الحليب جيداً : إذا زال اللون خلال أقل من (٨) ساعة وأكثر من (٦) ساعة.
- متوسط الجودة : إذا زال اللون خلال أقل من (٦) ساعة وأكثر من (٢) ساعة.
- رديء النوعية : إذا زال اللون خلال أقل من (٢) ساعة.

الاختبارات الميكروبيولوجية للحبوب

يوجد على سطوح الحبوب أحياء دقيقة متنوعة، جزء منها مصدره ريزوسفير النبات(الكائنات الحية الدقيقة المحيطة بالجذور). وجزء مصدره الغبار والحشرات.كما تنمو على سطح الحبوب –كما على سطح جميع النباتات– كائنات دقيقة متعايشة طبيعياً، تعدادها ليس بالكبير، كما أن التركيبة النوعية لها مستقرة إلى حد بعيد، إذ أن % (90) منها عبارة عن بكتيريا غير متبوغة تتبع للجنس *Pseudomonas*، وأغلبها عبارة عن :

Pseudomonas fluorescens و *Pseudemonas herbicola (Erwinia herbicola)*

وأيضاً المكورات Micrococci و بكتريا حمض اللبن والخمائر. في حين تشكل الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* والفطريات المجهرية نسبة بسيطة .

في ظروف محددة، يمكن اعتبار الأحياء الدقيقة المتعايشة طبيعياً مفيدة لأنها تعوق تغلغل المتطفلات في الأنسجة، لكن ينقلب نفعها ضرراً عند تخزين الحبوب في الشروط غير المناسبة.

هناك عدة عوامل تؤثر في نمو الأحياء الدقيقة على الحبوب أثناء التخزين هي: الرطوبة و درجة الحرارة و مستوى التهوية وكذلك سلامة الحبوب وحالة سطوحها (وجود خدوش من عدمها) .

يوجد الماء في الحبوب الناضجة بحالة مرتبطة ، غير متاح للاستخدام من قبل الكائنات الحية الدقيقة، الأمر الذي يعوق نمو الكائنات الدقيقة، إلا أن الأخيرة تبدأ بالتكاثر وبسرعة مع ارتفاع نسبة الرطوبة ودرجة الحرارة .

إن ازدياد وتيرة العمليات الميكروبيولوجية للحبوب المخزنة مع ارتفاع الرطوبة يؤدي إلى ارتفاع ما يسمى ***بدرجة الإحماء الذاتي*** للحبوب بشكل ملحوظ، الأمر الذي يقود إلى تبدل تركيبة الأحياء الدقيقة، حيث تختفي الكائنات الدقيقة المتعايشة طبيعياً وتبدأ بالتكاثر وبشكل كبير البكتيريا المقاومة للحرارة المرتفعة (على *حساب Erwina herbicola*). وكذلك الفطريات والأكتينومايسيتس. كما أن ارتفاع درجة الإحماء الذاتي

للحبوب إلى أعلى من (40-50)ْم يساعد على نمو البكتيريا المتبوّغة. والبكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة Thermophiles، وتتغيّر أيضاً التركيبة النوعية للفطريات، فالأنواع التابعة للجنس *Penicillium* الأكثر وجوداً في البداية (قبل التخزين)، يقل عددها، بينما يزداد تعداد الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* .

إن الانتشار (الوجود) الكبير لبكتيريا *Erwinia herbicola* في التركيبة الميكروبية للحبوب، يعتبر مؤشراً جيداً، يدل على ارتفاع نوعية الحبوب. كما أن الكمية الكبيرة من البكتيريا المتبوّغة والفطريات، يشير إلى احتمال انخفاض قدرة البذور على الإنبات. من جهة أخرى تعمل الظروف المناسبة لنمو الأحياء الدقيقة إلى تراكم منتجاتها السمية، ويمكن أن تبدو عند ذلك مظاهر التسمم على الحيوانات المتغذية على هذه الحبوب.

التحليل الميكروبيولوجي للحبوب: يتم إجراء التحليل الميكروبيولوجي للحبوب عن طريق:

أولاً – تقدير التعداد العام للبكتيريا الهوائية :

المواد والأدوات اللازمة:

عينة الحبوب المختبرة؛ رمل؛ رجّاج كهربائي، حمام مائي، وسط الآجار المغذي؛ أنابيب اختبار تحوي على ٩ مل ماء معقم لإجراء التخفيفات المتتالية، أطباق بتري؛ حاضنة.

الطريقة:

١- ينقل في ظروف معقمة (5) غ من الحبوب إلى حوجلة تحوي (50) مل ماءً عادياً (ماء صنبور) معقم و (2-3)غ رملاً معقماً .

٢- تُرجّ الحوجلة لمدة (10) دقائق في الرجّاج الكهربائي .

٣- يُسال وسط الآجار المغذي في حمام مائي عند (100)ْ م ويُنْتظر حتى تنخفض درجة حرارته إلى(45-50) م.

٤- تجرى التخفيفات المتتالية كالمعتاد $10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}$ (انظر طريقة العد بالأطباق).

٥- يؤخذ من كل تخفيف (1) مل ، ويوضع في أطباق بتري ، بحيث يخصص لكل تخفيف (3) أطباق .

٦- يُصَب الوسط المغذي في الأطباق، ويُخلط محتويات الطبق مع الوسط بشكل جيد وذلك بتحريك الطبق حركة رحوية بسيطة على سطحٍ مستوٍ.

٧- تُحضّن الأطباق مقلوبة عند (30)ْم لمدة (3-5) أيام .

٨- تُحسب عدد المستعمرات النامية والتابعة لكل تخفيف. ثم يحسب عدد الأحياء الدقيقة الموجود في (1) غ من الحبوب .

ثانياً: تقدير تعداد البكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة Thermophilic bacteria:

يتم تحديد البكتيريا المحبة للحرارة المرتفعة ، باتباع الخطوات السابقة . ولكن بدلاً من التحضين عند (30)ْم يجري التحضين عند (50)ْم لمدة (48) ساعة .

ثالثاً: تقدير تعداد الفطريات :

بنفس الخطوات التي تم إجراؤها في أثناء تحديد التعداد العام للبكتيريا الهوائية، يمكن أيضاً تقدير الفطريات. لكن يُستخدم من أجل ذلك وسط المالت المغذي [مالت (30)غ، آجار (20)غ]. يتم تحميض البيئة بحمض الليمون بواقع (0,5)غ/ليتر أو حمض اللبن المركز بواقع (2)مل/ ليتر. ويُؤخذ فقط من التخفيفات 10^{-2} , 10^{-3} .

رابعاً : تقدير بكتريا حمض اللبن :

١- يُحضّر وسط آجار الملفوف المكوّن من : مغلي الملفوف (900) مل ، مستخلص الخميرة (100) مل ، ببتون (10) غ ، غلوكوز (20)غ ، خلات الصوديوم (3,35) غ ، $MnSO_4$ (0,0025) غ ، آجار (20)غ . يعقم $CaCO_3$ مسبقاً و يضاف بواقع (5) غ لكل (200) مل من البيئة . تعقم البيئة عند(115)ْم لمدة (30) دقيقة .

٢- يؤخذ (5) غ من عينة الحبوب لتوضع في حوجلة تحوي (50) مل ماء معقم عادي (ماء صنبور) و (2-3) غ رمل .

٣- ترج الحوجلة بشكل جيد مدة (10) دقائق .

٤- تُجهز التخفيفات المتتالية كالمعتاد 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}, 10^{-5} ويؤخذ (1) مل من كل تخفيف ليوضع في أطباق بتري ، يخصص لكل تخفيف (3) أطباق .

٥- يسال الوسط المغذي (آجار الملفوف) في حمام مائي عند (100)ْم (إن كان صلباً) وينتظر حتى تنخفض حرارته إلى (45)ْم . ويُصب في الأطباق .

٦- تُحضَّن الأطباق مقلوبة عند (28-30)ْ م لمدة (5-6) أيام .

بعد إجراء التحليل الميكروبيولوجي للحبوب يتم:

- وضع المستعمرات النامية تبعاً لخواصها المزرعية في مجموعات .
- تجهيز محضر من كل مجموعة لمشاهدته تحت عدسة المجهر . ودراسة الخواص المجهرية لها.
- حساب عدد البكتيريا التابعة لكل مجموعة كنسبة مئوية من التعداد العام .

لاحظ ما يلي :

١- تمتاز الحبوب الطازجة (غير المخزنة) باحتوائها على حوالي (80)% من *Erwinia herbicola* ووجودها يعتبر-كما ذُكر- أمراً محموداً ومؤشراً إيجابياً يدل على جودة الحبوب، تشكل هذه البكتيريا مستعمرات أرجوانية ناصعة (صفراء ذهبية). كما تظهر مستعمرات *Pseudomonas fluoresens* صفراء مزرقة. وتبدو تحت المجهر على شكل عصية مشكلة للأبواغ.

٢- لا يلاحظ وجود النوعين آنفي الذكر في عداد ميكروفلورا الحبوب المخزنة، أو المخزنة في ظروف رطوبة مرتفعة. في حين يمكن أن توجد بكتيريا مكورة مشكلة لمستعمرات مستوية صغيرة بيضاء لمّاعة. وكذلك العصيات المتبوغة والأكتينومايسيتس والعصيات غير المتبوغة.

٣- تبدو مستعمرات بكتيريا حمض اللبن صغيرة تشبه حبوب العدس ومحاطة بهالة ناتجة عن تحلل $CaCO_3$ الداخلة في تركيب الوسط .

٤- عند دراسة الفطريات يمكن أن يُلاحظ وجود الأنواع التابعة للجنسين *Aspergillus* و *Pencillium* .