

الأحياء المجهرية

Microbiology

((الجزء العملي))

اعداد

المدرس المساعد

صفاء نعمت حسين

حفظ المزارع النقية وإدامتها

عند الحصول على مزارع نقية لبكتريا معينة يفضل حفظ هذه المزرعة بطريقة معينة تحول دون تلوثها وتعطيها الإدامة والديمومة لفترة ليست بقصيرة بغية إعادة تنشيطها للاستفادة منها لأغراض الدراسة تحفظ المزارع النقية في ممالات من الوسط الصلب الملائم Slant إذ تحفظ في الثلاجة مع تجديد الممالات بين فينة وأخرى لا تتجاوز (3) أشهر بالنسبة للبكتريا ويفضل حفظ المزارع في Slant أكثر من الأطباق ذلك لأن الممالات (في أنابيب اختبار) اقل عرضة للتلوث وقل أشغالاً للحيز داخل الثلاجة وأسهل تداولاً .

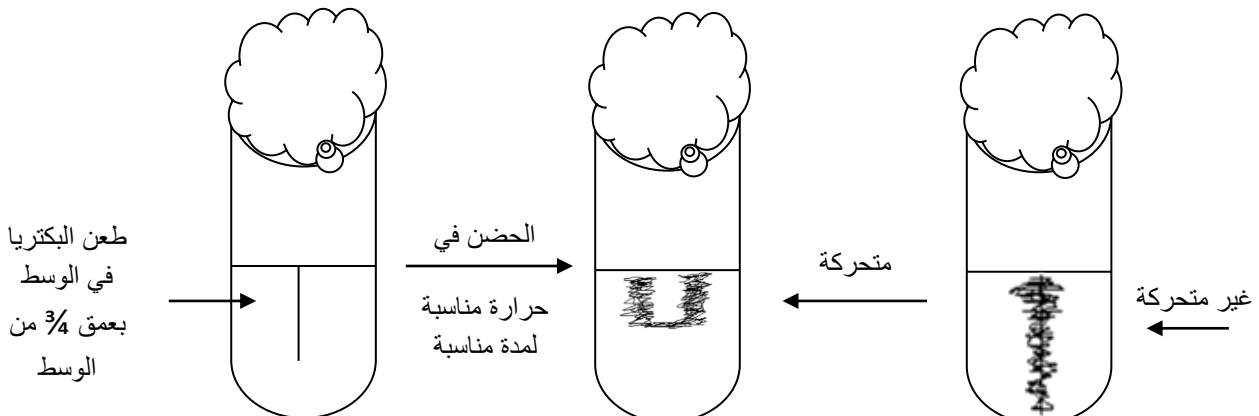
تحضر الممالات بإذابة الوسط الزراعي الصلب إذابة تامة في حمام مائي ، ثم يوزع في أنابيب اختبار ويعقم في 121 م° /15 دقيقة في جهاز المؤصدة ثم تترك أنابيب الاختبار بصورة مائلة في جو المختبر ليتصلب الوسط فيه ، ثم تخطط البكتريا المراد حفظها على سطح الوسط.

تحضن الأنابيب في حرارة مناسبة لزمن مناسب وحسب نوع البكتريا ودرجة حرارتها المثلى ثم تحفظ في الثلاجة وتجدد المزارع في الممالات كل ثلاثة أشهر.

وهناك العديد من الأحياء المجهرية لاينصح بحفظها في ممالات صلبة حاوية على مادة الاكار مثل الطحالب والابندائيات Protozoa والعاثات والفاجات لذلك تحفظ هذه المزارع في أوساط سائلة وتسمى عندئذ بـ Liquid Culter .

دراسة صفات مزارع الأحياء المجهرية Cultural Characteristics

عند دراسة كائن من الكائنات المجهرية ينبغي تحديد جميع صفات ذلك الكائن المورفولوجية (الشكلية) والمزرعية والفسلجية في مزارعه النقية وفي أوساط غذائية محددة صلبة كانت أم سائلة وعادة ما تتم دراسة الشكل الخارجي لمستعمرات البكتريا أو الأحياء المجهرية الأخرى في مزارع فتية لا تتجاوز عمرها 24 ساعة ، ويوضح الشكل المرفق مع المحاضرة أهم الخواص الزرعية للأحياء المجهرية من حيث الشكل واللون والارتفاع والحافة والعنمة والقوام والأخيرة في الأوساط السائلة ويمكن دراسة قدرة البكتريا على الحركة في الأوساط الصلبة أو شبه الصلبة Semi-Solid Media في أنابيب الاختبار وبطريقة الطعن داخل الأنبوبة ، إذ إن انتشار البكتريا على طول منطقة الطعن تعطي تصوراً عن مدى قدرة انتشارها بفعل قابليتها على الحركة بالأوساط .



عد الأحياء المجهرية بطريقة الأطباق القياسية (SPC) Standard Plate Count

هنالك طرق عديدة لعد الأحياء المجهرية الموجودة في عينة من التربة أو المواد الغذائية أو المياه أو الحليب ويستهدف من عد الأحياء المجهرية في هذه العينات التعرف على كثافتها العددية وبالتالي مقدار تلوثها ويمكن تقسيم طرق العد إلى :

1- الطريقة المباشرة Direct method

2- الطرق غير المباشرة Indirect Method

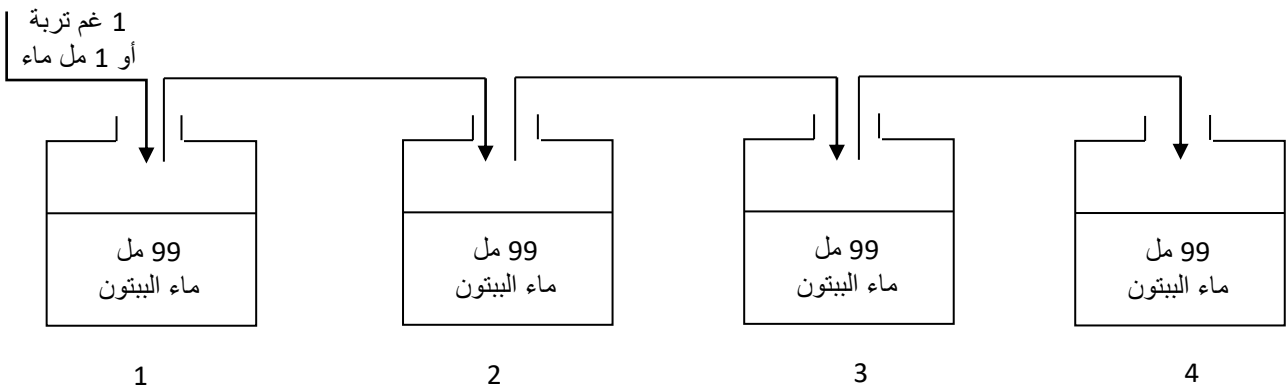
الطريقة التي سيتم دراستها هي طريقة الأطباق القياسية Standard Plate Count ويعبر عنها بمختصر (SPC) والتي تعد من الطرق غير المباشرة وتتلخص خطوات العمل فيها بما يلي:

أولاً: تحضير سلسلة من التخفيف العشرية Prepration of serial decimal dilution وذلك باتباع الخطوات التالية:

1- يضاف 1 غم (مل) من العينة (تربة، ماء ، حليب ،...) إلى قنينة التخفيف الأولى الحاوية على 99 مل من ماء البيبتون Peptone water ترج القنينة رجاً قوياً للحصول على مزيج متجانس.

2- ينقل 1 مل من محلول القنينة الأولى وبواسطة ماصة معقمة (تحت ظروف معقمة) إلى قنينة التخفيف الثانية والحوية أيضا على 99 مل من ماء البيبتون وترج القنينة رجاً جيداً.

3- تكمل بقية التخفيف وبنفس الطريقة لحين الوصول إلى التخفيف المناسب وما هو موضح أدناه:



رقم القنينة	1	2	3	4
مقدار التخفيف	$10^{-2} = \frac{1}{100}$	$10^{-4} = \frac{1}{10000}$	$10^{-6} = \frac{1}{1000000}$	$10^{-8} = \frac{1}{100000000}$

حيث يتم حساب التخفيف لكل مرحلة من المراحل حسب القانون الاتي:

$$\text{تخفيف المرحلة} = \frac{\text{الكمية و الحجم المنقول}}{\text{الحجم النهائي}} \times \text{تخفيف المرحلة السابقة}$$

على سبيل المثال : لو أردنا إيجاد التخفيف في القنينة رقم 3 فيتم تطبيق القانون كما يلي:

$$10^{-6} = \frac{1}{1000000} = \frac{1}{10000} \times \frac{1}{100} \leq \frac{1}{10000} \times \frac{1 \text{ مل}}{99 \text{ مل} + 1 \text{ مل}}$$

وهكذا بنفس الطريقة يتم إيجاد التخفيف الأخرى

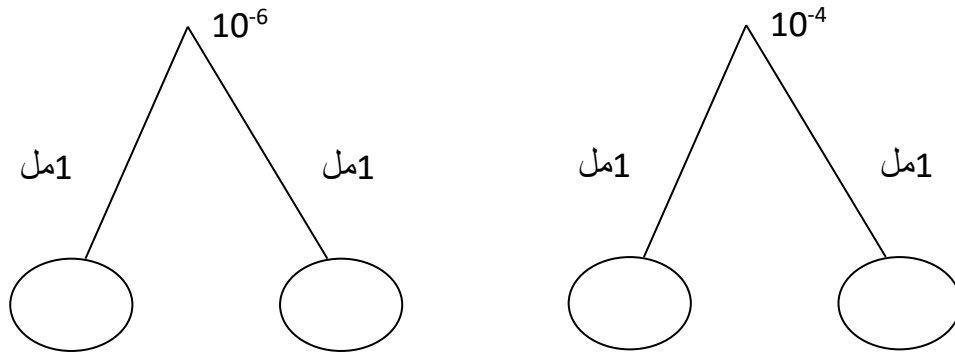
إن 10^{-2} ، 10^{-4} ، 10^{-6} ، 10^{-8} يعني إن العينة قد تم تخفيفها بهذا المقدار وبالتالي يعني إن مقدار الأحياء المجهرية الموجودة في العينة قد تم تخفيفها بهذا المقدار.

س: ما الهدف من استخدام ماء البيبتون peptone water بتركيز 0.1% في عملية التخفيف ؟

ج/ للمحافظة على البكتريا الضعيفة فسلجياً عند إجراء التخفيف .

ثانياً: صب الأطباق Plate pouring

1- يؤخذ 1 مليلتر من التخفيف الأخيرة على اعتبار إن التخفيف الأولى تحتوي على أعداد كبيرة من الأحياء المجهرية يصعب عدّها ، لذلك نفرض إننا نقلنا 1 مليلتر من التخفيف 10^{-4} إلى طبق بتري معقم ونعمل له مكرر أي نأخذ 1 مليلتر من نفس التخفيف ووضعه في طبق بتري آخر، تكرر العملية نفسها على التخفيف 10^{-6} وكما موضح :



- يستخدم في عملية النقل ماصة معقمة وتتم العملية تحت ظروف معقمة .
- عند نقل 1 مليلتر من التخفيف 10^{-4} إلى الطبق يعني إننا نقلنا أحياء مجهرية مخففة بنفس المقدار أي 10^{-4} ، أما عند نقل 0.1 مليلتر من التخفيف 10^{-4} إلى الطبق فيصبح لدينا في الطبق تخفيف 10^{-5} لأننا أخذنا عشر الكمية أي عشر $\frac{1}{10000}$ أي بمعنى آخر: $10^{-5} = \frac{1}{100000} = \frac{1}{10} \times \frac{1}{10000}$

- 2- يضاف إلى كل طبق من الأطباق الأربعة الوسط الغذائي Nutrient Agar بمقدار 15-20 مليلتر في كل طبق وتدور الأطباق يميناً ويساراً أي بحركة دائرية باتجاه عقرب الساعة وبعكسه لخمس مرات لغرض مزج العينة مع الوسط داخل الأطباق ، يصب الوسط إلى الأطباق وهو بدرجة حرارة 45م° تقريباً وفي ظروف معقمة .
- 3- تترك الأطباق إلى أن يتصلب الوسط ثم توضع في الحاضنة بصورة مقلوبة بدرجة حرارة 35-37م° لمدة 48 ساعة .

ثالثاً: حسابات الطريقة

تؤخذ الأطباق التي تتراوح فيها عدد المستعمرات من 30-300 مستعمرة بعين الاعتبار مع إهمال الأطباق التي تزيد فيها عدد المستعمرات عن 300 أو يقل فيها عدد المستعمرات عن 30 ، لأن زيادة المستعمرات عن 300 يعني احتمال حصول تنافس بين الأحياء المجهرية وعدم نمو الأحياء المجهرية الضعيفة غير قادرة على التنافس على المواد الغذائية في الأطباق ، أما ما قل عن 30 فإنه لا يمثل الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية في العينة.

يطبق القانون التالي لإيجاد عدد البكتريا أو الأحياء المجهرية في 1 غم من العينة :

عدد الأحياء المجهرية في 1غم في العينة = معدل عدد المستعمرات في الطبق X مقلوب التخفيف يطرح عادة عدد الأحياء المجهرية الناتجة من القانون السابق من عدد المستعمرات في طبق control الذي يحتوي فقط على الوسط الغذائي أي لا يحتوي على أي عينة والذي يحضن تحت نفس الظروف التي تحضن فيها الأطباق الحاوية على التخفيف وذلك للتخلص من الأحياء المجهرية التي يكون مصدرها التلوث .

س: ماهو الفرق بين الطرق المباشرة وغير المباشرة ؟

ت	الطرق المباشرة	الطرق غير المباشرة
1	تستخدم في عد الأحياء المجهرية في عينات معينة كالحليب	تستخدم في عد الأحياء المجهرية في كافة أنواع العينات (التربة، الحليب،.....)
2	لا يمكن تمييز الخلايا الميتة عن الخلايا الحية	تعد طريقة خاصة لحساب عدد الأحياء المجهرية الحية في العينة فقط دون الميتة لأن الأخيرة لا تكون مستعمرات في الأوساط الزرعية
3	تعد طريقة سريعة في عد الأحياء المجهرية	تحتاج هذه الطريقة إلى وقت أطول
4	لا يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والاعفان	يمكن استخدام هذه الطريقة لحساب الخمائر والاعفان وذلك بتغيير الوسط الغذائي N.A واستخدام الوسط PDA بدلاً عنه والخاص بتنمية الخمائر والاعفان
5	لا يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء المجهرية حسب درجات الحرارة الملائمة لنموها	يمكن استخدام هذه الطريقة في عد الأحياء المجهرية حسب درجات الحرارة الملائمة فمثلاً : البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic أو البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة Mesophilic وذلك بحضن الأطباق في درجات الحرارة الملائمة لنموها .