

مقرر مباديء الأحياء المجهرية العملي

م.م هدى أحمد ياسين

قسم علوم التربة والموارد المائية

كلية الزراعة/ جامعة البصرة

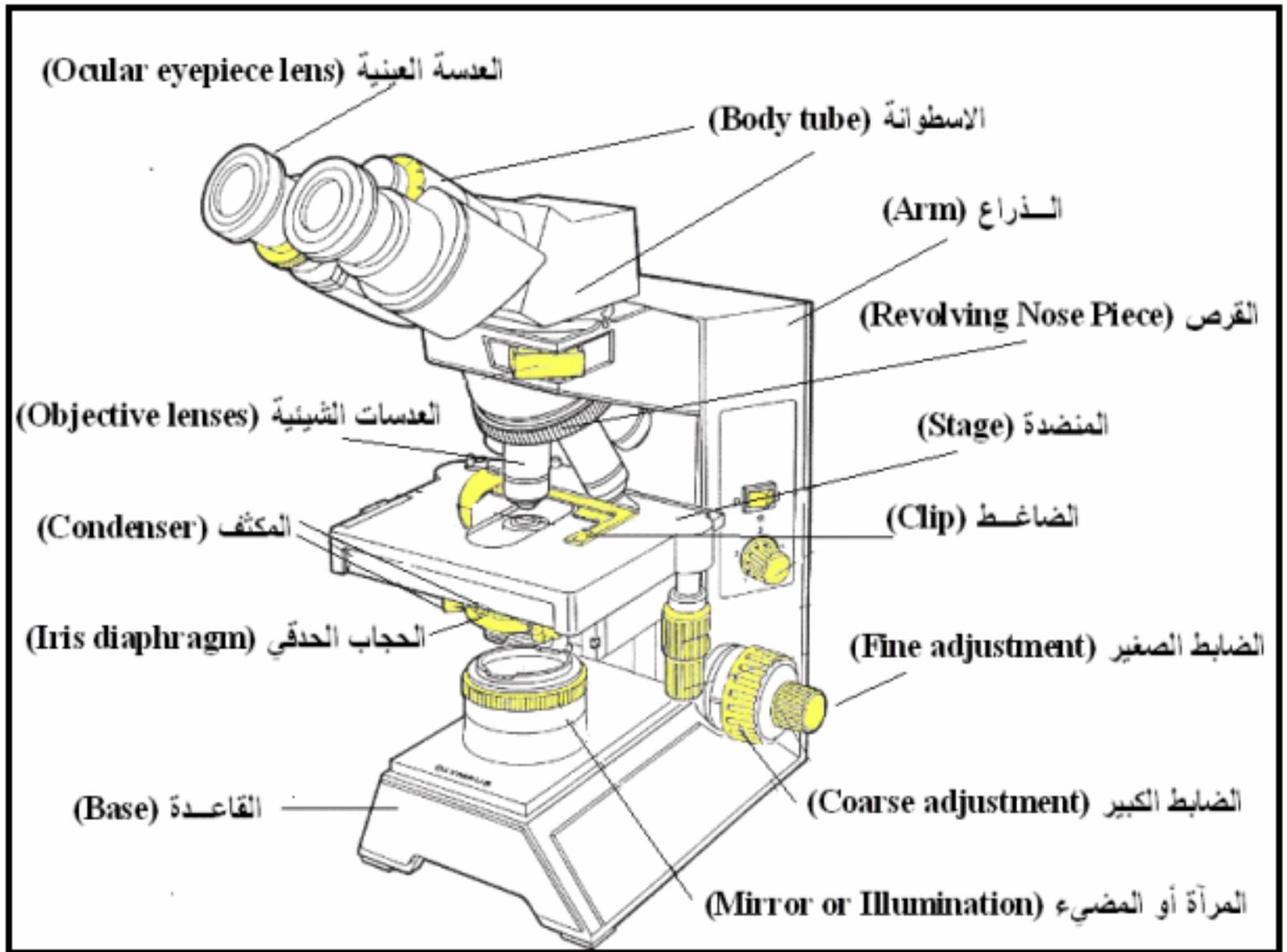
العراق / البصرة

مبادئ الأحياء المجهرية العملي

- **المجهر واهميته** : يعتبر المجهر من أكثر أجهزة ومعدات مختبرات الأحياء المجهرية استعمالاً، حيث يكاد لا يخلو مختبر عملي من استعمال من هذه الآلة المهمة. ولذا فلا بد دراسة المجهر وأجزائه وصيانته وأستعمال بكل دقة ووضوح.
- **فالمجهر الذي يستعمل في أغلب مختبرات الأحياء المجهرية هو من المجاهر الضوئية المركبة والمعروف بالمجهر ذو الحقل المضيء (Bright-Field microscope) أي أن الحقل المجهرى مضيء والجسم المفحوص معتم. وتكون قوة التكبير مثل هذه المجاهر عادة حوالي (1000) مرة.**

(المجهر الضوئي المركب) وسبب استخدام العدسة الزيتية :

- يوضع الزيت (زيت السدر Cedar wood oil) على الشريحة في حالة الفحص بالعدسة الشيئية الزيتية حيث تكون فيها الرؤية اوضح من العدسة الشيئية الجافة بسبب لأنه الزيت له معامل انكسار للضوء يعادل معامل انكسار الزجاج (1.51) اشعة الضوء التي تنفذ من سطح العلوي لشريحة او غطاء الشريحة الى فتحة العدسة الزيتية لا يحدث فيها انكسار وبذلك فإن سعة مخروط الضوء الذي يدخل العدسة الزيتية وبذلك تزداد قوة التمييز اما في صالة لاستخدام العدسة الجافة فان معامل انكسار الزجاج يختلف عن معامل انكسار الهواء وبذلك تشتت حزمة الضوء الداخل الى فتحة العدسة الشيئية الجافة .



الشكل (١- ١١) أجزاء المجهر الضوئي المركب





• تصبغ البكتريا:

• ان خلايا البكتريا تكون شفافة لذلك يجب ان تصبغ من أجل رؤيتها بسهولة والتعرف على أشكالها وتراكيبها الخارجية مثل الأسواط والغلاف وكذلك تراكيبها الداخلية مثل السبورات والاجسام النووية .ويمكن تقسيم الصبغات المستعملة الى:

• (1)الصبغات الطبيعية :

• وهي الصبغات التي تتواجد بشكل طبيعي ويمكن أستخلاصها من بعض النباتات

• (2)الصبغات الصناعية أو التركيبية :

• وهي الصبغات التي تستعمل بكثرة حاليا وتحضر من قطرات الفحم وتسمى صبغات الانلين Aniline dyes وهي الصبغات مشتقة من المركب الحلقي البنزين (C_6H_6) وتعرف الصبغات على أنها مركب عضوي

- تحتوي على مجموعة حاملة للون ومجموعة مساعدة للون والمجموعة الحاملة للون تعطي للصبغة خاصية اللون أما المجموعة المساعدة فتعطي للصبغة خاصية الانحلال الالكتروليتي وتقسم الصبغات الى:-

- 1-الصبغات الحامضية: Acid dyes

- وهذه الصبغة تتأين لتعطي الجزء الصبغي من الجزيء يحمل شحنة كهربائية سالبة (Anion)

- 2-الصبغات القاعدية

- وهذه الصبغات تتأين لتعطي الجزيء الصبغي من الجزيء والذي يحمل شحنة كهربائية موجبة (كاتيون Cation) وتستعمل الصبغات الحامضية لتصبغ السائتوبلازم أما القاعدية فهي تصبغ المادة النووية .

- وتعتبر الصبغات القاعدية مثل الفوكسين القاعدي والكريستال البنفسجي والسفرانين

- وتعتبر الصبغات القاعدية أهم في دراسة البكتريا من الصبغات الحامضية لان خلية البكتريا تحمل شحنة سالبة لكونها غنية بالاحماض النووية لذلك تصبغ بشدة بالصبغات القاعدية

- ومن طرق التصبغ هو :

• (1)التصبغ البسيط: Simple staining

• وهو التصبغ الذي تستخدم فيه صبغة واحدة فقط حيث يمكن استعمال صبغات متعددة مثل أزرق الميثيلين Methylene blue او صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet البلورات الارجوانية وتظهر البكتريا ملونة (مصبغة) بلون الصبغة المستخدمة .

• طريقة عمل التصبغ البسيط في الكتاب ص(11)

• (2)تصبغ جرام: Gram staining

• وهو من الطرق المهمة من طرق التصبغ المركب أو التصبغ التفريقي وأول من أستعملها كريستيان جرام Christian Gram عام 1884 م لذلك فأنها تعرف بأسمة وفي هذه الطريقة تقسم الى :

• تصبغ جرام : Gram Staining

• وهو من الطرق المهمة من طرق تصبغ المركب او التصبغ التفريقي (التمييزي) وأول من استخدمها كريستيان جرام Christian Gram عام 1884م لذلك فإنها تعرف باسمه وفي هذه الطريقة تقسم البكتريا الى:

• البكتريا التي تصبغ بالصبغة القاعدية البلورات البنفسجية (Crystal Violet) بوجود اليود بدرجة لا يمكن معها إزالة الصبغة منها عن طريق الغسل بالكحول او الأسيتون.

• البكتريا التي يمكن إزالة الصبغة منها (Crystal Violet) بسهولة باستعمال الكحول.

• المجموعة الأولى تسمى البكتريا الموجبة لتفاعل جرام (+) Gram Positive اما المجموعة الثانية فتسمى البكتريا السالبة لتفاعل جرام (-) Gram Negative

- ولتسهيل رؤية المجموعة الثانية تستعمل صبغة أخرى ذات لون احمر وهي صبغة السفرانين Safranin والتي تضاف بعد الغسل بالكحول وهذه الصبغة تسمى الصبغة المضادة او العكسية حيث تصطبغ الخلايا السالبة باللون الأحمر والسبب في ذلك لان سطوح الخلايا الموجبة لصبغة جرام او الجزء القريب من سطوحها يحتوي على ملح المغنيسيوم لحامض الرايبونيوكلريك والتي تكون مركب معقد مع كل من البروتين الخلوي وصبغة الكريستال البنفسجية واليود وهذا المعقد يثبت الصبغة في الخلية ويجعلها أكثر مقاومة للإزالة بالكحول.
- اما البكتريا السالبة لصبغة جرام لان التركيب الكيميائي لسطحها لا يحتوي على ملح المغنيسيوم لحامض الرايبونيوكلريك لذلك فان صبغة الكريستال البنفسجي لا تثبت في الخلايا حيث تزال عند الغسل بالكحول.

طرائق اخذ العينات للأحياء المجهرية:

- تؤخذ العينات لاختبار التلوث الميكروبي من الاسطح المختلفة مثل مناظير العمل او عنابر المستشفيات او الهواء او الماء او من أماكن مختلفة من جسم الانسان مثل الانف، الاذن، الفم او أي مكان اخر
- تستخدم المسحة القطنية (Cotton Swab) لأخذ العينات وهي عبارة عن حشوة من القطن ملفوفة حول نهاية ماسك من البلاستيك معقمة ومحفوظة بشكل مغلق، وتختلف حجوم ال Swab فقد تكون كبيرة او متوسطة او صغيرة الحجم وهناك أنواع مختلفة منها فقسم منها توضع في سوائل معقمة او متعادلة او في وسط غذائي Media في قنينة محكمة الاغلاق او تحفظ داخل أكياس من البلاستيك بشكل معقم ومحكم الاغلاق.

- تؤخذ عينات من مياه الشرب ومياه الأنهار والمجاري بواسطة قناني معقمة ومغلقة جيداً وذات أحجام مختلفة.
- كما تؤخذ عينات من الهواء بواسطة انابيب خاصة شافطة للهواء (اذ تحتوي على مضخة لشفط الهواء) وتكون الانابيب والمضخة معقمة.
- وتتبع الطرق التالية لأخذ العينات الميكروبية:
- ارتداء القفازات
- يفتح غطاء الانبوبة المعقمة التي تحتوي على المسحة القطنية
- تستخرج المسحة القطنية ثم تدور بصورة جيدة حول المكان المراد اخذ العينة منه، فإذا كان المكان جافاً يجب ان تستخدم مسحة قطنية رطبة.
- تعاد المسحة القطنية الى الانبوبة وتغلق جيداً ثم ترقم الانبوبة.
- ترسل العينة فوراً الى المختبر لزراعتها خلال 24 ساعة على وسط غذائي صلب موجود في الطبق Petridihs
- تحفظ الاطباق بصورة مقلوبة في الحاضنة على درجة حرارة 35-37°م لمدة أسبوع والسبب في حفظ الاطباق بصورة مقلوبة لتجنب تكاثف بخار الماء على غطاء الطبق من الداخل مما يؤدي الى سقوطه على المستعمرات النامية على سطح طبقة الاكار Agar فيتسبب في انتشارها وتداخلها.

اولاً: وصف المستعمرات الفردية النامية على سطوح البيئات الصلبة

1) شكل المستعمرة

- نقطية
- دائرية
- خيطية
- غير منتظمة
- جذرية
- مغزلية

2) ارتفاع المستعمرة

- مسطحة
- مرتفعة
- محدبة
- كثيرة التحدب
- مرتفعة المركز

• (3) شكل حافة المستعمرة

• كاملة

• متموجة

• مفصصة

• مسننة

• خيطية

• مجعدة

• (4) سطح المستعمرة

• ناعم

• خشن

• حلقات مختلفة الأقطار متحدة المركز.

• (5) الصفات الضوئية للمستعمرة:

• معتمة

• نصف شفافة

• نصف شفافة لامع

• (6) قوام المستعمرة

• زيتي

• لزج

• غشائي

• هش

ثانياً: وصف المستعمرات النامية على الاكار السلانت

:Slant

- كمية النمو:
- ضئيل
- متوسط
- غزير
- شكل النمو:
- خيطي
- مسنن
- خرزي
- منتشر
- جذري
- شجري

- إنتاج الصبغة:
- الصفات المزرعية العامة المستعملة في أغراض التصنيف هي إنتاج الصبغات او انتاج اللون فهناك أنواع من البكتريا تنتج صبغة تبقى في داخل الخلية يتكون عنها نمو بكتيري ملون، في حين أن بعض الأنواع الأخرى تفرز صبغة خارجية تلون البيئة.
- الرائحة:
- نمو ليس له رائحة
- إذا وجدت رائحة يذكر مدى تشابهها للروائح المعتادة والمعروفة.