

## المحاضرة الثالثة - درس الأحياء المجهرية المتقدم - الجزء العملي-

### عزل البكتريا من البيئة Isolation of bacteria from the environment

كل ما حولنا مليء بالحياة فهناك احياء في الهواء، التربة، الماء والغذاء حياؤو لا نعرف عنها إلا القليل ...

#### أ - القطرة طريقة Hunging Drop Slide

\*كل متر مكعب من الهواء يحتوي على مئات الالاف من البكتريا، الفطريات.. الخ . عند العطاس يتحرر من 10 ملايين جرثومة لا عجب ان تنتشر الامراض مثل السل، الانفلونزا ، الجدري... عن طريق الهواء يذكر ان احد الصواريخ التي اطلقتها روسيا تمكنت من عزل بكتريا من عينة هواء اخذت عن بعد 40 ميل.

#### المواد المطلوبة:

مجهر ضوئي- Loop - شريحة القطرة المعلقة Hanging Drop Slide - Swab - ديتول  
مزرعة بكتريا في وسط مغذي سائل- nutrient agar - nutrient broth

#### طريقة العمل:

- 1-تعقيم الايدي والمناضد بالمطهر قبل البدء بالعمل.
- 2-تنظيف شريحة القطرة المعلقة بالماء والصابون وتجفف جيدا مع الغطاء.
- 3- افحص تحت قوة التكبير 10 ثم حول على قوة التكبير الاعلى ثم سجل ما تشاهد.

\*يجب الاسراع في فحص العينة وذلك لان التأخير قد يؤدي إلى تكاثف الماء المحصور بين الغطاء والشريحة وبالتالي عدم وضوح الرؤية اضافة إلى تباطؤ حركة البكتريا مع مرور الوقت.

#### ب - الفلورا الطبيعية Normal skin flora

الاحياء المجهرية التي تتواجد بشكل طبيعي على الجسم أو فتحاته تدعى الفلورا الطبيعية Normal flora تعتبر هذه الكائنات تعايشية commensals ، لأنها لا تضر المضيف بل احيانا تلعب دورا هاما لصالحه حيث تمنع الكائنات المضرة من مهاجمة الجلد بسبب تنافسها مع الاحياء الممرضة على المواد الغذائية اضافة الى ان بعضها قد ينتج انزيمات أو مواد مثبطة للكائنات الغريبة على الجسم .  
التعرف على هذه الاحياء الموجودة طبيعيا على الجلد غاية في الاهمية لأنها كثيراً ما تصادفنا كملوثات في الهواء (على خلايا الجلد التي تتناثر باستمرار وتبقى في الجو) من اهم انواع هذه البكتريا:

#### 1- *Staphylococcus epidermidis*

كروية ، وعنقودية التجمع (تحت المجهر) تتواجد طبيعيا على جلد الانسان وبعض الحيوانات.

#### 2- *Staphylococcus aureus*

على الاقل 21 % من الأشخاص يحملون هذه الجرثومة خاصة في فتحات الانف(بشكل طبيعي) وهي لا تضر المضيف ولكنها تكون ممرضة عند دخولها إلى داخل الجسم إذ تسبب التسمم الغذائي او الجروح .

#### 3- *Micrococcus luteus*

كروية تتواجد على الجلد لبعض الاشخاص وهي غير ممرضة . وهي احد الجراثيم الملوثة للهواء.

#### 4- *Propionbacterium acnes*

عصيات لا هوائية يعتقد انها تسبب حب الشباب بسبب عزلها من هذ المناطق.

#### 5- *propionbacterium granulosum* عصيات غير ممرضة .

#### المواد:

-القطن -كحول 70% - cotton swab .-اطباق nutrient agar .-محلول الملح الفسيولوجي المعقم (NaCl %  
0.9 saline في الماء) .

## طريقة العمل:

- 1- تمسح منطقة الجلد بقطعة قطن مشبعة بالكحول بتركيز 70% دقيقة ولتطهير المنطقة من الاحياء المجهرية غير المتوطنة Transient organisms والتي لا تشكل جزء من الفلورا الطبيعية وتترك لتجف .
- 2- يرطب swab بالسلاين ويمسح الجلد في منطقة محددة لمدة 15 ثانية .
- 3- يفتح الطبق تحت ظروف معقمة ويلقح سطح الاكار بواسطة مسحة القطني ويتم التخلص من المسحة بوضعها في بيكر يحتوي على ديتول.
- 4- يحضن الطبق في الحاضنة لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م.
- 5- تفحص الاطباق وتدرس انواع المستعمرات وإشكالها ما ألوانها قوامها .. اما لدراسة الفلورا في الهواء يترك الطبق مفتوح في المختبر لمدة نصف ساعة ثم يغلق ويحضن بنفس الطريقة.

## طرق نقل وعزل البكتريا تحت ظروف معقمة

تتواجد البكتريا في الطبيعة في بيئات مناسبة لها من درجة حرارة ورطوبة و pH اما في المختبر فتنمى البكتريا على مواد تدعى الاوساط الزرعية . تدعى الاداة التي تستخدم لنقل البكتريا من مكان إلى اخر loop وهي عبارة عن سلك من البلاتين أو الكروم النيكل حيث تتميز هذه المعادن بأنها تسخن بسرعة وتبرد بسرعة.

## تصبغ البكتريا Bacterial Staining

لو فحصنا البكتريا تحت المجهر بشكلها الطبيعي وبدون تصبغ لشاهدنا اجسام صغيرة حية وشفافة ودقيقة وأحيانا متحركة كما في طريقة القطرة المعلقة . كذلك يمكن فحص البكتريا بصورتها الطبيعية بعد تعليق الخلايا في المحلول الفسيلوجي saline ثم تؤخذ قطرة من العالق وتوضع على شريحة نظيفة ثم يوضع الغطاء وتفحص . هذه الطريقة تدعى wet mount يمكن ان نشاهد البكتريا وأحيانا بعض الحبيبات داخل الكائنات المجهرية.

\*ملاحظة : عند فحص عالق من البكتريا بالطرق اعلاه نلاحظ ان حركة البكتريا نوعان:

## 1- الحركة البروانية Brownian movement

هي حركة غير حقيقية للبكتريا تظهر نتيجة تذبذب او اهتزاز البكتريا نتيجة تصادم جزيئات المحلول مع خلايا البكتريا وهي تحصل بين الجزيئات ضمن المحلول.

## 2- حركة البكتريا:

حركة ناتجة عن امتلاك بعض الانواع من البكتريا على اعضاء الحركة flagella او اسواط البكتريا من مكان الى اخر. ان شفافية الخلايا وحركتها المستمرة تجعل من الصعب دراسة الخلايا البكتيرية بشكل مفصل لذلك نلجأ الى تصبغ البكتريا لكي تبدو الخلايا بشكل واضح وبشكل ثابت يسمح لنا بالفحص المطول.

## أ- تحضير المسحة Smear Preparation

وفيما يلي خطوات Smear وهي اول واهم خطوة في طريق التصبغ هو تحضير المسحة وفائدة كل خطوة:

- 1-تنظيف الشريحة بالماء والصابون لإزالة الاوساخ والدهون العالقة وتجفف.
- 2-بواسطة التأشير ترسم دائرة صغيرة أو مربع على احد جهات الشريحة وذلك لتحديد مكان عينة البكتريا على الشريحة.
- 3- في حالة اخذ عينة بكتريا من وسط سائل يعقم loop ثم تنقل قطرة من الوسط السائل (بعد رجه) وتوضع ضمن الدائرة المرسومة تفرش على شكل طبقة رقيقة وتترك لتجف في الهواء.

اما في حالة اخذ عينة من وسط صلب فينقل جزء من المستعمرة بواسطة loop الى قطرة من ماء الحنفية وتخلط جيدا وتفرش بشكل طبقة رقيقة ضمن الدائرة المرسومة ويعقم loop ثم تبرد على حافة الوسط الصلب تترك لتجف بالهواء لمدة 10 دقائق مع مراعاة ان تكون المسحة رقيقة لكي تصبغ الخلايا بشكل متساو.

- 4- تثبت المسحة بتمرير الشريحة 3 مرات فوق لهب بنزين بحيث لا ترتفع حرارة الشريحة عند لمسها باليد بعد كل مرة تمرر على اللهب وهي اهم خطوة في تحضير المسحة إذ تعمل على:
- 1- تثبيت أو التصاق العالق بالبكتريا لكي لا نفقدها خلال الغسل عند التصبيغ.
  - 2- إذا كانت البكتريا مرضية تفقد امراضيتها أي تفقد خطورتها وتصبح غير قادرة على الاصابة.
  - 3- تبقى البكتريا محافظة على شكلها وحجمها عند اجراء التثبيت بالصورة الصحيحة.

**SMEAR** : هو تحضير مجفف لخلايا البكتريا على الشريحة الزجاجية في نهاية عملية التثبيت تصبح الشريحة جاهزة للتصبيغ .

### ب -الصبغة البسيطة (Positive and negative stains) Simple Stain

تعد طريقة التصبيغ البسيط من اسرع وأسهل طرق تصبيغ البكتريا سميت بهذا الاسم لأننا نستخدم نوع واحد من الاصبغ في خطوة واحدة فقط .ان معظم الصبغات التي تستخدم في الاحياء المجهرية تعد املاح من نوعين:

- 1-املاح حامضية وهي التي يكون فيها الايون الحامل للصبغة أو اللون chromophore سالب الشحنة (anion) مثال sodium+ eosinate الصبغة في هذه الحالة هي الايوسين.
- 2-املاح قاعدية يكون فيها الكروموفور موجب الشحنة cation مثال methylene blue+ chloride- الصبغة في هذه الحالة هي المثلين الازرق .

النوع الاول من الاصبغ هي الحامضية بمعنى ان الكروموفور الحامضي يتحد مع قاعدة NaOH لتكوين مركب ملحي هو الصبغة . ليعطي النوع الثاني من الاصبغ هي القاعدية إذ تتفاعل مع حامض مثل HCl ليعطي المركب الملحي أو الصبغة إذا الاصبغ الحامضية هي التي تحمل شحنة سالبة (على الكروموفور) والقاعدية هي التي تحمل شحنة موجبة (على الكروموفور ايضا) .

اما البكتريا فقد تحتوي بداخلها على العديد من المكونات الحامضية (سالبة الشحنة) مثل الحوامض النووية السكريات المتعددة الحامضية بروتينات ... الخ كما تحتوي ايضا على مكونات ذات طبيعة قاعدية (موجبة الشحنة) ولكن من المعروف ان الحصيلا النهائية للشحنات Net charge على جسم البكتريا ككل هي الشحنة السالبة أي تتصرف البكتريا بصورة عامة كجسم سالب تجاه الصبغات.

إذا الاصبغ القاعدية Positive Stains مثل violet, basic fuchsin و Crystal و Methylene blue ، وغيرها تنجذب إلى الخلايا البكتريا وبالتالي تصطبغ بها .اما الاصبغ الحامضية negative stains ذات الشحنة السالبة تتنافر مع الشحنة السالبة على الخلية البكتيرية ومن ثم ترفضها البكتريا لتصطبغ الخلفية فقط.

### المواد المستخدمة:

- مزرعة لبكتريا *Bacillus subtilis* بعمر 24 ساعة عصوية الشكل.
- مزرعة لبكتريا staphylococcus بعمر 24 ساعة كروية عنقودية.
- صبغة قاعدية methylene blue , crystal violet و صبغة حامضية nigrosin .
- ملقط ، ورق ترشيع ، قلم تأشير وعروة زرع.

### طريقة العمل : positive stain

- 1-تنظيف الشريحة بالماء والصابون
- ملاحظة :حتى الشرائح غير المستعملة يجب تنظيفها لانها مطلية بمواد حافظة.
- 2-بواسطة قلم التأشير ارسم دائرتين في وسط الشريحة.
- 3- بواسطة loop انقل قطرة ماء وضعها وسط كل دائرة

- 4- يعقم loop ثم يبرد .إذا كانت المزرعة صلبة انقل كمية قليلة جدا من مستعمرة لبكتريا عسوية وامزجها جيدا مع قطرة الماء .هذه العملية تعمل على تفكيك افراد المستعمرة المترابطة مع بعضها للحصول على خلايا مفردة يعقم loop مرة اخرى وكرر العملية نفسها لمزرعة بكتريا كروية .اما إذا كانت مزرعة البكتريا سائلة فلا داعي لقطرة الماء .
- 5- بواسطة loop يتم فرش عالق البكتريا ضمن الدائرة على شكل طبقة رقيقة تترك لتجف في الهواء ، ثم تمرر فوق لهب بنزين بالاستعانة بملقط لغرض التثبيت.
- 6-تغمر الشريحة بأحد الصبغات القاعدية مثل المثلين الازرق لمدة دقيقة واحدة
- 7-تغسل الشريحة بماء الحنفية وتجفف بوضع الشريحة بين ورقتي ترشيع والضغط الخفيف عليهما افحص بالمجهر.

### طريقة العمل : Negative stain

- 1-ضع قطرة ماء على شريحة نظيفة وامزج معها جزء قليل من البكتريا الى ان تصبح القطرة عكرة.
  - 2-اضف حملة loop من صبغة حامضية مثل نكروسيين وامزجها مع الخليط اعلاه لكي تكون طبقة رقيقة.
  - 3-جفف في الهواء وافحص تحت المجهر.
- ما الفرق بين الطريقتين لكل بكتريا ؟

### ج-الصبغات التفريقية Differential stains

ملاحظة : عند فحص قطرة عالق بكتريا سواء على شريحة اعتيادية wet mount أو بطريقة القطرة المعلقة لاحظنا شكل البكتريا، حجمها، حركتها، وترتيبها ان كانت سبحية ، ثنائية، عنقودية....

ولكن من مساوي هذه التحضيرات الحية هي ان الشريحة سريعة الجفاف تحت تأثير حرارة المصدر الضوئي للمجهر اضافة إلى خطورة تلوث اليدين بالبكتريا الحية . ممكن تلافي هذه الاخطاء باستخدام طرق التصيبغ حيث تقتل البكتريا عند تحضير المسحة خلال عملية التثبيت بالحرارة أو بفعل الاصباغ القاتلة للبكتريا .

لذلك عند الانتهاء من التصيبغ ممكن الاكتفاء بغسل الشريحة بالماء والصابون .واخيراً ممكن الاحتفاظ بالشريحة لفترات اطول.