سكشن 1

Microbiology

هو العلم الذى يدرس الكائنات الحية الدقيقة التى لا ترى بالعين المجردة ويقاس حجمها بالميكرون (μ)

ومن أمثلة الكائنات الدقيقة

١- البكتيريا Bacteria
٢- الفطريات Fungi
٣- الطحالب Algae
٤- الفيروسات Viruses
٥- البروتوزوا Protozoa

Microorganisms

نافعة:
- تدخل فى صناعة المنتجات الغذائية واللبنية مثل الفرانكفورتر - الزبادى
- وانتاج مواد ذات أهمية اقتصادية
- أهمية بيئية لم تكسير بعض المواد الضارة فى الطبيعة لإستكمال دورة العناصر

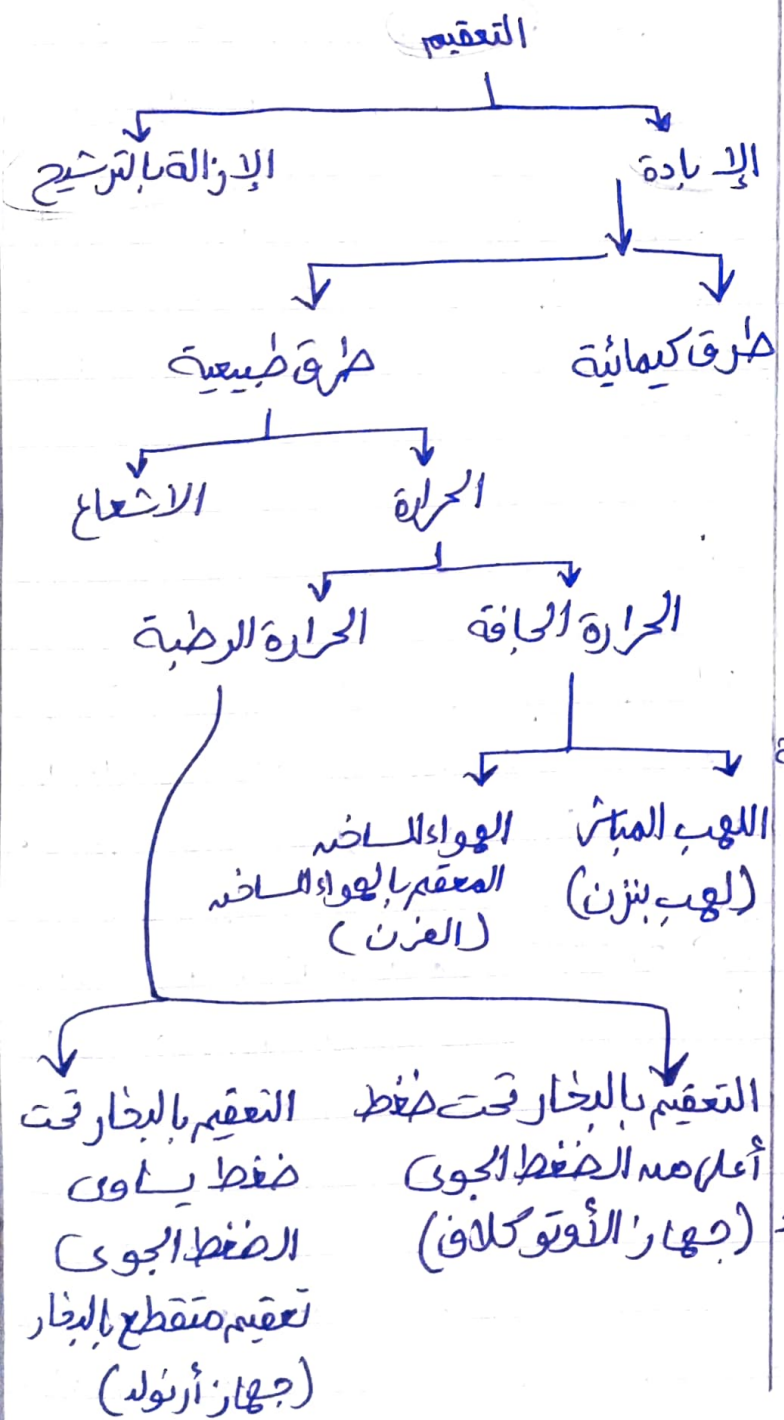
ضارة:
- مسببة للأمراض مثل المسببة للتيفود والدوسنتاريا
- مسببة لفساد الأغذية

"التعقيم" Sterilization

هو التخلص التام من جميع صور الحياة للكائنات الحية الدقيقة سواء بالإبادة أو بالإزالة

أهمية التعقيم

١- دراسة كل ميكروب على حدى فى وسط يخلو من أى نوع آخر من الميكروبات
٢- استخدام أدوات وأماكن معقمة أثناء العمليات الجراحية
٣- ابادة المزارع الميكروبية الممرضة



- التعقيم بالطرق الطبيعية

① التعقيم بالحرارة

الأساس العلمي

← تتلف مكونات الخلايا الميكروبية (البروتين - المادة الوراثية) عند تعرضها للحرارة العالية حيث تعمل على إحداث ما يسمى بالـ Denaturation

← أي تغير في طبيعة البروتين والمادة الوراثية فتفقد الخلية قدرتها على النمو والتكاثر

س الحرارة الرطبة (بخار الماء) أكفأ من الحرارة الجافة (الهواء الساخن) في التعقيم (علل)

بسبب وجود الماء وهو موصل جيد للحرارة فيساعد على زيادة درجة الحرارة بشكل عالي ويكون التعقيم ذا كفاءة عالية

ولأن الهواء ردئ التوصيل للحرارة

- التعقيم بالحرارة الجافة

① باللهب المباشر (لهب بنزن) ← Flaming لا 6

• تصل درجة حرارة اللهب المباشر إلى 1560 م°

• يستخدم لتعقيم المواد التي يمكن تسخينها لدرجة الاحمرار دون التأثير على خواصها

• حيز التعقيم 15 سم

الأدوات التي تعقم به:

- أبر التلقيح (مستقيمة - ذات عقدة)

- المشارط والملاقط بعد غمرها في الكحول علشان يساعد على الاشتعال

- الشرائح الزجاجية

- فوهات (الأنابيب - الزجاجات - الفلاسكات

الاحتياطات الواجب اتباعها عند استخدام

١- استخدام اللهب عندما يظهر في صورة مخروط الداخلي لونه أزرق (لهب بنزن)

٢- عدم وجود تيارات هوائية

٣- تعقم به الأدوات جافة

② المعقم بالهواء الساخن (الفرن) HoTair

- جهاز مزدوج الجدار به مصر حراري لتسخين الهواء وترموستات لضبط درجة الحرارة وأرفف مثقبة توضع عليها الأدوات ويمر من خلال الهواء الساخن

- درجة حرارة التعقيم ← (160 - 180) م لمدة (2 - 3 ساعة)

الأدوات التي تعقم به:

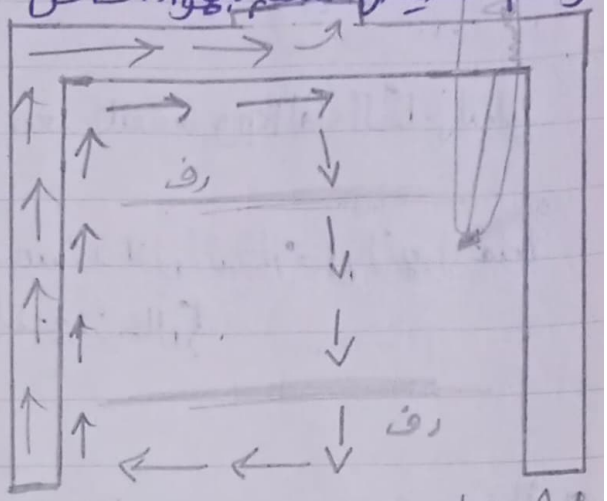
• أطباق بتري بعد وضعها في علب تعقيم الأطباق

• الماصات الزجاجية بعد سد فوهتها الواسعة بقطعة من القطن ووضعها في علب تعقيم الماصات

• الأنابيب والزجاجات والفلاسكات الزجاجية بعد سد الفوهة بسدادة قطنية

ترمومتر خروج الهواء الساخن

رسم تخطيطي للمعقم بالهواء الساخن



مصدر حراري
غاز - كهرباء

الاحتياطات الواجب اتباعها عند استخدامه:

١- توضع الأدوات قبل بدأ التشغيل ولا يفتح الجهاز أثناء التشغيل لعدم قطع اتصال الوقت

٢- توضع الأدوات الزجاجية جافة لتقليل وقت التعقيم

٣- يبدأ حساب الوقت المطلوب عند وصول درجة الحرارة بداخل الجهاز للدرجة المطلوبة

٤- عدم فتح الجهاز إلا بعد انخفاض درجة حرارته ووصولها لدرجة حرارة الجو العادية (علل) ؟

بسبب الفرق في الحرارة الشديد الذي يمكن أن يؤدي لكسر الأدوات ويحدث لها شروخ وهذا يحدث تلوث للأدوات

٥- عدم ازدحام الجهاز فوق طاقته حتى يسمح بمرور الهواء الساخن بين الأدوات بسهولة

التعقيم بالحرارة الرطبة

أ- تعقيم تحت ضغط عالي

جهاز الأوتوكلاف - Auto Clave

الأساس العلمي ← يغلي السائل عندما يتساوى ضغطه البخاري مع الضغط الواقع عليه

والجهاز عبارة عن

← وعاء مزدوج الجدار ليتحمل الضغط العالي يسخن به الماء لدرجة الغليان ويتصاعد البخار ومع حبسه يرتفع الضغط فترتفع درجة غليان الماء

الجهاز مزود بأجهزة تحكم مختلفة

← ١- مانومتر لقياس الضغط

٢- ثرموستات لضبط درجة الحرارة

٣- جهاز للتحكم في الوقت

٤- صمام أمان لتصريف البخار الزائد

• يوجد داخل الجهاز سبت صدأ السلك توضع به الأدوات المراد تعقيمها

الجدول التالي يوضح الضغط ودرجات الحرارة المطلوبة المقابلة له والوقت اللازم لإتمام عملية التعقيم

الضغط	درجة الحرارة	الوقت
٥ر٠ ض.ج	١١١°م	٣٠ دقيقة
١ر٠ ض.ج	١٢١°م	١٥-٢٠ دقيقة
١ر٥ ض.ج	١٢٨°م	٥ دقائق

والجدول السابق معناه أن
عند زيادة الضغط تزيد الحرارة
وعند زيادة الضغط والحرارة يقل الوقت
المستغرق في عملية التعقيم

علل لضمان كفاءة التعقيم في الأوتوكلاف
يجب أن يملأ الحيز الداخلي
للجهاز تماماً بالبخار و طرد الهواء الموجود
بالجهاز ؟
لأن الهواء يعيق التوصيل للحرارة
لذلك يجب طرده حيث وجوده
ولو بنسبة ضئيلة يؤدي لتقليل
درجة الحرارة

- عند ثبوت الضغط وزيادة نسبة
الهواء تقل درجة الحرارة

فيه جدول في الـ pdf

الأدوات والمواد التي تعقم به
هي كل المواد التي لا تتغير خواصها
الطبيعية والكيميائية عند تعرضها لدرجة
حرارة أعلى من ١٠٠°م مثل
الماء المقطر - البلاط - الخراطيم والسدادات
المحاطية

البيئات الغذائية التي لا تحتوي على
(لبد - سكر - جيلاتين)
وأجهزة الترشيح

ويستخدم الجهاز في إبادة المزارع الميكروبية
الممرضة

الاحتياطات الواجب اتباعها عند استخدامه

١- الجهاز معد للتعقيم وبه الماء الكافي لتوليد
البخار
2- التأكد من إحلال البخار محل الهواء تماماً
داخل الجهاز علل؟

٣- حساب الوقت بعد وصول درجة الحرارة
والضغط داخل الجهاز للدرجة المطلوبة
٤- عدم فتح الجهاز إلا بعد انخفاض الضغط
داخل الجهاز لمستوى الضغط الجوي
العادي علل؟
بسبب الفرق في الضغوطات الشديد
الذي يؤدي لكسر المواد المراد تعقيمها

٥- تحتاج المواد العروية إلى فترة
أطول في التعقيم عن المواد الحقيقية؟
لأنها تعتبر مواد لزجة تعيق التعقيم
فتأخذ وقت أطول من المعتاد

٦- تحتاج المواد المتعادلة إلى فترة أطول في
التعقيم عن المواد الحامضية أو القلوية علل؟
لأنه كل أنواع البكتيريا تنمو على المواد
المتعادلة على عكس الحامضية والقلوية
ولذلك تكون عملية التعقيم فتأخذ وقت
أطول لكثرة البكتيريا
كما أن البيئة القلوية والحامضية
لها تأثير قاتل على الميكروبات

ب- التعقيم تحت الضغط الجوى العادى
تعقيم متقطع بالبخار
لـ TYNdalliZaTion
(جهاز أرنولد)

الأساس العلمى:
يتم التعقيم على ١٠٠م° لمدة ٣٠ دقيقة لمدة ٣ أيام متتالية مع ترك البيئات فى فترة مابين التعقيم على درجة حرارة ٣٠-٣٧م°

بيئة غذائية
خلايا خضرية + جراثيم
↓
اليوم الأول
١٠٠م°/٣٠ق
↓
بيئة (جراثيم) غذائية
↓
٣٠م°
لمدة ٢٤ ساعة
↓
بيئة غذائية
خلايا خضرية + جراثيم
↓
اليوم الثانى ١٠٠م°
٣٠ ق
↓
بيئة غذائية (جراثيم)
↓
٣٠م°/٢٤ ساعة
↓
بيئة غذائية
(خلايا خضرية)
↓
اليوم الثالث
١٠٠م°
٣٠ق
↓
بيئة غذائية معقمة

الأدوات والمواد التى تعقم به:-
تعقم به كل المواد التى تتغير خواصها الطبيعية والكيمائية عند تعرضها لدرجات حرارة أعلى من ١٠٠م° والبيئات المحتوية على (لبن - سكر - جيلاتين)

الاحتياطات التى يجب اتباعها عند استخدامه
١- الجهاز يحتوى على التعقيم وبه الماء الكافى لتوليد البخار
٢- حساب الوقت بعد وصول درجة الحرارة الى ١٠٠م° وتشبع الجهاز بالبخار
٣- يتم التعقيم لمدة ثلاثة أيام متتالية
٤- إخراج الأدوات من الجهاز بمجرد الانتهاء من التعقيم

س ← هل يعتبر الغليان من طرق التعقيم؟
لا، لا يعتبر لأنه ليس كل الميكروبات تموت عند درجة الغليان

س ← هل يمكن استخدام الأوتوكلاف كأرنولد؟
نعم يمكن وذلك عن طريق عدم غلق الصمامات بطريقة محكمة

التعقيم بالاشعاع Radiation

الأساس العلمي
عند تعرض الخلايا الميكروبية للأشعة خاصة القصيرة الطول الموجي تحدث مجموعة من التفاعلات الكيمائية الضوئية التي تؤدي الى تلف مكونات الخلية (بروتين - مادة وراثية)
فتفقد قدرتها على النمو والتكاثر
• هناك علاقة عكسية بين الطول الموجي والطاقة المنبعثة

الأدوات والمواد التي تعقم بها:-

- الأدوات الطبية البلاستيكية (حقن - أطباق - ماصات - قفازات)
- يستخدم في تعقيم حجرات العمليات ودورات المياه ومعامل وزراعة الأنسجة
- يستخدم لحفظ بعض المواد الغذائية (لحوم - أسماك - معلبات - مياه معدنية ومياه غازية)

التعقيم بالمواد الكيميائية

الأساس العلمي: تسبب تلف لبروتين الخلية الميكروبية والمادة الوراثية
تفقد الغشاء السيتوبلازمي خاصيته النفاذية الاختيارية

تقسم المواد الكيميائية في تأثيرها على الميكروبات الى نوعين

مواد قاتلة للميكروبات (مطهرة) Disinfectants
- Bactericides Germicides
  - محلول السليمان (كلوريد الزئبقيك)
  - الكحول
  - الفينول 5%
  - محلول 5% كريزول
  - 0.25% كلوروفورم
  - 0.25% فورمالدهيد

مواد مثبطة لنمو الميكروبات (حافظة) Antiseptics
- Bacteriostatics
  - المواد الحافظة (حامض اللاكتيك)
  - حامض البنزويك
  - حامض الخليك
  - حامض السوربيك

المواد والأدوات التي تعقم بالمواد الكيميائية

١- البشات (باستخدام الكحول أو مواد مطهرة عموماً) مثل: فينول - محلول سليمان
٢- الأيدي بـ (كحول - فينول)
٣- الدم (يضاف الكلوروفورم أو الفورمالدهيد الى الدم بنسبة 0.25% ثم التسخين في حمام مائي درجة ٥٧°م حتى يتطاير أثرهما

- لا تستخدم المواد الكيميائية في تعقيم البشات الغذائية لأنه بقائها فيها يقضي على الميكروبات المراد تنميتها

التعقيم بالإزالة Filtration

الأساس العلمي: يمر السائل المراد تعقيمه من خلال قرص قطر ثقوبه أصغر من قطر الخلايا الميكروبية فتحجز الخلايا الميكروبية على سطح القرص وتعزل المكونات مع استخدام مضخة تفريغ للإسراع من عملية الترشيح

قطر الخلايا الميكروبية يتراوح بين

$H \leftarrow (0{,}5 \leftarrow 0{,}45)$

واستخداماته

← يستخدم لتعقيم السوائل التي تتغير خواصها الطبيعية والكيميائية بالحرارة

أمثلة

- الكحربات تتكرين إذا عقمت بالحرارة
- البروتينات - الانزيمات - الأحماض الأمينية
  ← تتجلط
- سيرم الدم يتجلط
- بيكربونات الصوديوم تتحول لكربونات صوديوم
- اليوريا تتحلل
- الفيتامينات
- الهرمونات
- الأوكسينات

للتخلص من الجراثيم والفيروسات

أنواع المرشحات

① مرشح عنائن
لم يتم الترشيح خلال قرص من نترات أو خلات السليلوز

② مرشح زجاجي
يتم الترشيح خلال قرص من ألياف زجاجية مضغوطة

③ مرشح رانيتس
يتم الترشيح خلال قرص سيليك من الأسبستوس

④ مرشح برکفيلد
يتم الترشيح خلال شمعة من أخلفة الدياتوما (لحالب جرثومي)

⑤ مرشح تشمبرلاند
يتم الترشيح خلال شمعة من الخزف غير المصقول

الاحتياطات الواجب اتباعها عند استخدامه

قبل عملية الترشيح يتم تعقيم الجهاز كاملاً (المرشح - القابلة - جميع الملحقات الأخرى) عن الأوتوكلاف بعد لفه بورق كرافت بعد الانتهاء نقوم بتنظيف المرشح عن طريق ١- امرار ماء في الاتجاه العكسي لعملية الترشيح

٢- امرار حمض كبريتيك مركز ساخن أو هيدروكلوريك ٥٪ للتخلص من المواد البروتينية

٣- غسيل المرشح بالماء المقطر

اختبار كفاءة التعقيم Sterility Test

هو اختبار يجرى على جميع البيئات والوسائل التي عقمت بالطرق السابقة لمعرفة مدى كفاءة تعقيمها

أولاً ← اختبار كفاءة تعقيم البيئات المعقمة بالحرارة

وذلك بتحضين البيئة على 30 م° لمدة يومان ويستدل على كفاءة التعقيم بعدم ظهور نموات ميكروبية في البيئة

ثانياً اختبار كفاءة تعقيم الوسائل المترشحة

يدل على كفاءة التعقيم بتلقيح جزء من الوسائل المترشحة في بيئة غذائية معقمة سبق اختبار كفاءة تعقيمها ثم التحضين - عدم ظهور نموات الميكروبات في البيئة يدل على كفاءة التعقيم بالترشيح

صيانة وتداول الأدوات المعقمة

يجب الحفاظ على الأدوات والبيئات المعقمة بعد تعقيمها من التلوث مرة أخرى لحين استخدامها ويتم ذلك من خلال تغطية وغلق هذه الأدوات قبل تعقيمها بمواد (القطن غير الماص)

~~يشترط فيها الآتي~~

يشترط فيها الآتي

١- يسمح بمرور البخار والهواء الساخن اللازمين للتعقيم
٢- يسمح بمرور الأكسجين اللازم لتنمية الميكروبات
٣- يحجز الميكروبات الخارجية ويمنع دخولها

Sec 2 البيئات المعملية

(البيئات الغذائية)

① تعريف البيئة الغذائية: هى الوسط الغذائى الذى يحتوى على جميع العناصر الغذائية التى يحتاج اليها الكائن الحى فى النمو والتكاثر ولكن فى صورة ذائبة

② أهمية البيئة الغذائية

١- تستخدم لتنمية الميكروبات وإكثارها
٢- تستخدم لعزل أنواع من الميكروبات على بيئات متخصصة
٣- // لدراسة بعض الخواص الفسيولوجية للميكروبات
٤- // لحفظ المزارع الميكروبية النقية
٥- // لتشجيع الميكروبات لإنتاج مواد مرغوبة

③ شروط البيئة الغذائية

- يجب توافر العناصر التالية ← ضوئية ذات غذاء ذاتى (Photo-chemo)

① مصدر طاقة
② مصدر كربون (Auto-Hetero)
③ مصدر نيتروجين
④ مصدر أملاح معدنية
⑤ الماء
⑥ الاحتياجات الهوائية
⑦ عوامل مشجعة للنمو
⑧ درجة حموضة البيئة (PH)

④ ضبط درجة PH البيئة الغذائية

① استخدام ورق الـ PH ② استخدام الأدلة وجهاز مقارنة الألوان
③ استخدام جهاز الـ PHmeter

⑤ طرق تعقيم البيئات الغذائية المختلفة

① فى حالة البيئات التى تتحمل مكوناتها درجات حرارة أعلى من ١٠٠ م° (أوتوكلاف) ← بواسطة
② بواسطة جهاز أرنولد فى حالة البيئات التى لا تتحمل مكوناتها درجة حرارة أعلى من ١٠٠ م°
③ باستخدام المرشح سيتز فى حالة البيئات السائلة التى لا تتحمل مكوناتها أى درجات حرارة ويحتاج ترشيحها

ملحوظة هامة ← بعض أنواع البكتيريا تحتاج لأوكسجين والبعض الآخر لا يحتاج

- اللبن مينفعش يتعقم بالمرشحات

٦ تجميد البيئات المعملية

- يتم اضافة مواد مجمدة Solidifying agents للبيئات السائلة لتحويلها لبيئات شبة صلبة وبيئات صلبة وهذه المواد ليس لها علاقة بالقيمة الغذائية للبيئة ومنها (مادة الأجار - الجيلاتين)
- أهمية تجميد البيئات سهولة تداولها - اعطاء سطوح مختلفة الشكل

الأجار

- مادة كربوهيدراتية معقدة التركيب تستخلص من بعض الطحالب البحرية من جنس Gelidium
- لا تحللها الميكروبات
- تتجمد عند درجة 43° وتنصهر (تسيل) عند درجة 100° (مداها الحراري)
- يضاف بنسبة 1.5 - 2 % للبيئة

الجيلاتين

- مادة بروتينية ناقصة التركيب تستخرج من مادة الكولاجين الموجودة في أغشية وعظام الحيوانات
- تحللها بعض الميكروبات التي لها القدرة على افراز انزيم الجيلاتينيز
- تتجمد عند 25 وتنصهر عند 27 (مداها الحراري)
- يضاف بنسبة 15 - 20 % للبيئة

٧ خطوات تحضير البيئة المعملية

١ وزن المكونات وإضافتها لكمية الماء المطلوبة ٣ ترشيح البيئة
٢ خلط المكونات بالغليان مع التقليب ٤ ضبط درجة الـ PH
٥ تعبئة البيئة وتغطيتها بالقطن غير الماص وتعقيمها وتركها لتتصلب

- عند قياس الـ PH لمادة صلبة يتم القياس قبل اضافة الأجار

٨ تقسيم البيئات تبعاً لقوامها

- بيئات سائلة
  - بيوتون معذى
  - بيتون الكربات
  - بيتون الكربات لاختبار التخمر
  - اللبن
- بيئات صلبة
  - جيلاتين معذى
  - آجار معذى
  - آجار الكربات
  - سترات الصوديوم
- بيئات شبه صلبة
  - يضاف الآجار بنسبة 0.5 - 1.0 % للبيئة

أولاً: البيئات السائلة — التركيب: لتر

١- بيئة البويون المغذى Nutrient Broth
- 3 جرام مستخلص لحم ← مصدر كربون + 5 جرام ببتون ← مصدر للنيتروجين + إضافة كربون
- تضبط درجة الـ PH على ٧
- تعقم في جهاز الأوتوكلاف
- تستخدم في تنمية معظم البكتيريا ويشتق منها العديد من البيئات الأخرى

٢- بيئة بويون الكربات
- بويون مغذى + 5-10 جرام سكر
- تعقم في جهاز أرنولد
- تضبط على درجة ٧ P.H
- تستخدم لتنمية الميكروبات التي تحتاج السكر للنمو والتكاثر مثل ← (الخمائر - الاكتينوميسيتات)

٣- بيئة بويون الكربات لاختبار التخمر
- بويون كربات + دليل حموضة وقلوية + أنبوبة درهام مقلوبة
- درجة الـ PH ٧
- تعقم في جهاز أرنولد
- تستخدم لاختبار وتعيين المجاميع الميكروبية التي تخمر الكربات والتي تنتج حامض وغاز

ملحوظات هامة
١- التخمر ← انتاج بكتيريا حموضة
٢- الدليل أو الكاشف يستخدم للكشف عن التخمر
٣- أنبوبة درهام ← انتاج حامض أو غاز دليل على حدوث التخمر ← تكون فقاعات داخلها أي تكون غاز

٤- بيئة اللبن
- لبن خزه طازج (خالي الدسم) + دليل عباد الشمس بنسبة 2% صد محلول 5%
- درجة الـ PH ٧
- تعقم في جهاز أرنولد
- تستخدم لاختبار وتعيين المجاميع الميكروبية التي تخمر الكربات وتنتج حامض وغاز في التعيين والتعرف على الميكروبات تبعاً للتغيرات التي تحدث في مكونات البيئة

البيئات الصلبة

التركيب لترفي كل من آجار مغذى جيلاتين مغذى آجار السكريات أما سترات الصوديوم ← بيئة معدنية

① بيئة الآجار المغذى Nutrien agar
بيئة بويون مغذى + 15-20 جرام آجار
- درجة الـ PH 7
- تعقم في جهاز الأتوكلاف
- تستخدم في تنمية معظم الميكروبات والعد الكلي

② بيئة آجار السكريات
بويون سكريات + 15-20 جرام آجار
- درجة الـ PH 7
- تعقم في جهاز أرنولد
- تستخدم لتنمية الميكروبات التي تحتاج السكر للنمو والتكاثر مثل: الخمائر - الاكتينوميسيتات

③ بيئة الجيلاتين المغذى
بيئة بويون مغذى - 150-200 جرام جيلاتين
- درجة الـ PH 7
- تعقم في جهاز أرنولد
- تستخدم في دراسة قدرة الميكروبات على تحليل الجيلاتين

④ بيئة سترات الصوديوم
أملاح معدنية + سترات صوديوم + دليل Bromothymol blue + آجار
↳ مصدر للكربون
- درجة الـ PH 7
- تعقم في الأتوكلاف
- تستخدم لدراسة قدرة الميكروب على استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون

ملحوظة: البيئة لو نمت في السترات هتبقى لونها أزرق - لو منمتش البيئة في السترات هيبقى لونها أخضر

⑨ تقسيم البيئات تبعاً لطبيعتها

- بيئات طبيعية
  - بيئة اللبن
  - بيئة الدم
- بيئات تركيبية
  - بيئات مخلقة معروفة التركيب
    - بيئات عضوية: الآجار المغذي
    - بيئات معدنية: بيئة الطحالب
  - بيئات مخلقة غير معروفة التركيب
    - بيئة مستخلص التربة
    - سيرم الدم
    - مهضوم النباتات

⑩ تقسيم البيئات تبعاً للغرض من استخدامها

- Selective: بيئات اختيارية — بيئة سترات الصوديوم
- Differential: بيئات مفرقة — بيئة لبن عباد الشمس — تفرق بين أكثر من نوع من البكتيريا
- Enrichment media: بيئات اكثار — Tetrathionate Groth — تكون سائلة

المزارع الميكروبية

هي عملية ادخال ميكروب
هي لبيئة غذائيه وتركه لكي ينمو
وتوجد مزارع نقية ← تحتوي على نوع واحد فقط من البكتيريا
مزارع مختلطة ← تحتوي على أكثر من نوع من البكتيريا
اذا احتوت على ميكروبات غير مرغوبة أصبحت مزرعة ملوثة
Contaminated Culture

كيف تتحول البيئة الغذائية إلى مزرعة ميكروبية ؟

البيئة الغذائية

تلقيح ← (إدخال الميكروبات إلى البيئة)

↓

بيئة غذائية ملقحة (بيئة غذائية + خلايا حية)

تحضين ← (توفير الظروف المناسبة للنمو)
(حرارة + احتياجات هوائية)

↓

مزرعة ميكروبية (بيئة غذائية + خلايا حية نامية)

التلقيح ← (Inoculation)

هو ادخال ميكروبات حية أو مواد محتوية على ميكروبات حية في بيئة غذائية معقمة وذلك باستخدام ابرة التلقيح

التحضين ← (Incubation)

هو توفير درجة الحرارة المناسبة لنمو الميكروب مع توفير احتياجاته الهوائية له ويستخدم لهذا الغرض جهاز يسمى بالمحضن Incubator وهو عبارة عن جهاز مزدوج الجدار به

- مصدر حرارى
- رفوف معدنية مثقبة
- ثرموستات لتنظيم الحرارة والحفاظ عليها على درجة حرارة ثابتة

أهم الاحتياطات الواجب مراعاتها أثناء عملية التحضين

١- عدم فتح باب المحضن لتجنب انخفاض درجة الحرارة
٢- تحضن الأنابيب في وضع عودى
٣- تحضن الأطباق مقلوبة (علل)

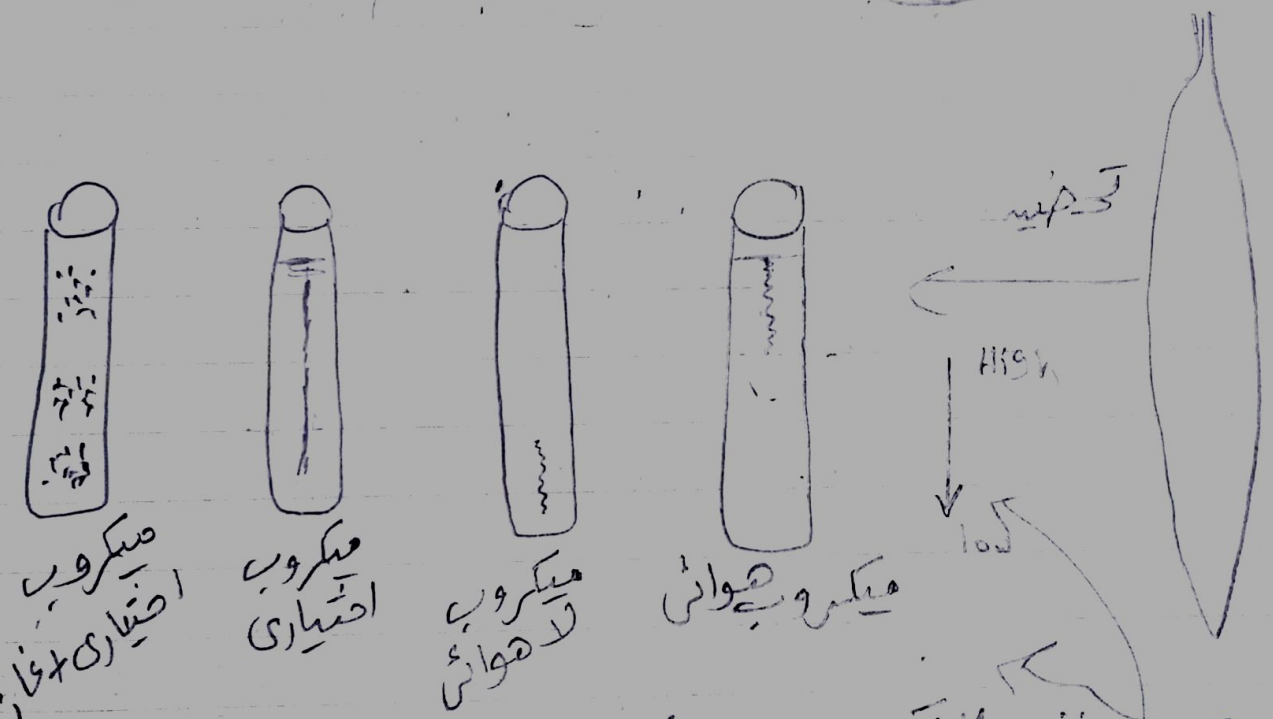
لأن ذلك يقلل من تبخر الماء ويمنع تكثفه على السطح الداخلى لغطاء الطبق

أنواع المزارع الميكروبية تُقسم على حسب طبيعة النمو في البيئة الغذائية

١- المزارع الصلبة

٢- مزارع مائلة ← (SlopeCultures)
↳ (Slants)

٢- مزارع عميقة ← صلبة ← (STaborDeepCultures) →



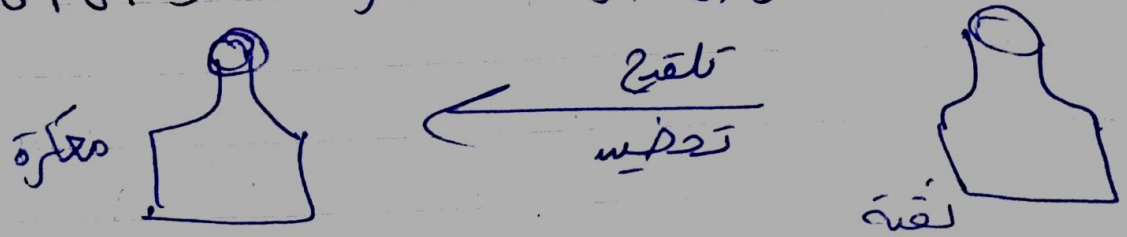
٣- مزارع مهتزة ← نفس الفكرة وتركيز الأكسجين

Shake cultures ← في شبه صلبة

٤- مزارع أطباق PlateCultures

٢- المزارع السائلة

← النمو الميكروبي عبارة عن عكارة Turbidity



طرق حفظ المزارع الميكروبية

توجد عدة طرق للحفظ بحالة حية ونقية لمدة طويلة ودون حدوث أى تغير فى الصفات الفسيولوجية والمورفولوجية والمزرعية

تشمل هذه الطرق

١- نقل المزارع على البيئات المعقمة بصفة مستمرة
٢- حفظ المزارع على درجات حرارة منخفضة فى الثلاجة
٣- التجفيف (التجفيف تحت التجميد) Lyophilization

← من أهم الطرق لحفظ المزارع

أهمية حفظ المزارع الميكروبية

١- دراسة الصفات للكائنات الحية الدقيقة
٢- استخدام الميكروبات فى مجال الهندسة ~~الزراعية~~ الوراثية

من ص 80 ← ص 86
من البى دى اف لأنهم رسومات

أشكال البكتيريا

١- الخلايا الكروية Cocci ← مفردها ← (Coccus)
٢- الخلايا العصوية القصيرة Short rods
٣- // // الطويلة Bacilli (مفردها Bacillus)
اما خلايا عصوية طويلة غير متجرثمة فى سلال
واما // // // متجرثمة
٤- الخلايا الحلزونية Spiral (مفردها ← Spirillum)
٥- الخلايا الضمية أو الواوية الشكل Vibrio
٦- البكتيريا الخيطية Actinomycetes
← خيوط طويلة رفيعة متفرعة غير مقسمة بجدر عرضية تتكاثر بالكونيديا

أشكال الفطر

١- الفطريات الخيطية molds ← خيوط طويلة سميكة ~~غير~~ متفرعة مقسمة
٢- الخمائر Yeasts ← خلايا بيضاوية كبيرة تتواجد فى مجاميع غير منتظمة تتكاثر بالتبرعم

سكشن ميكرو 3

أجزاء الميكروسكوب

- كل ماله علاقة بالرؤية ← الأجزاء البصرية
- الأجزاء الميكانيكية ①

الأجزاء الميكانيكية

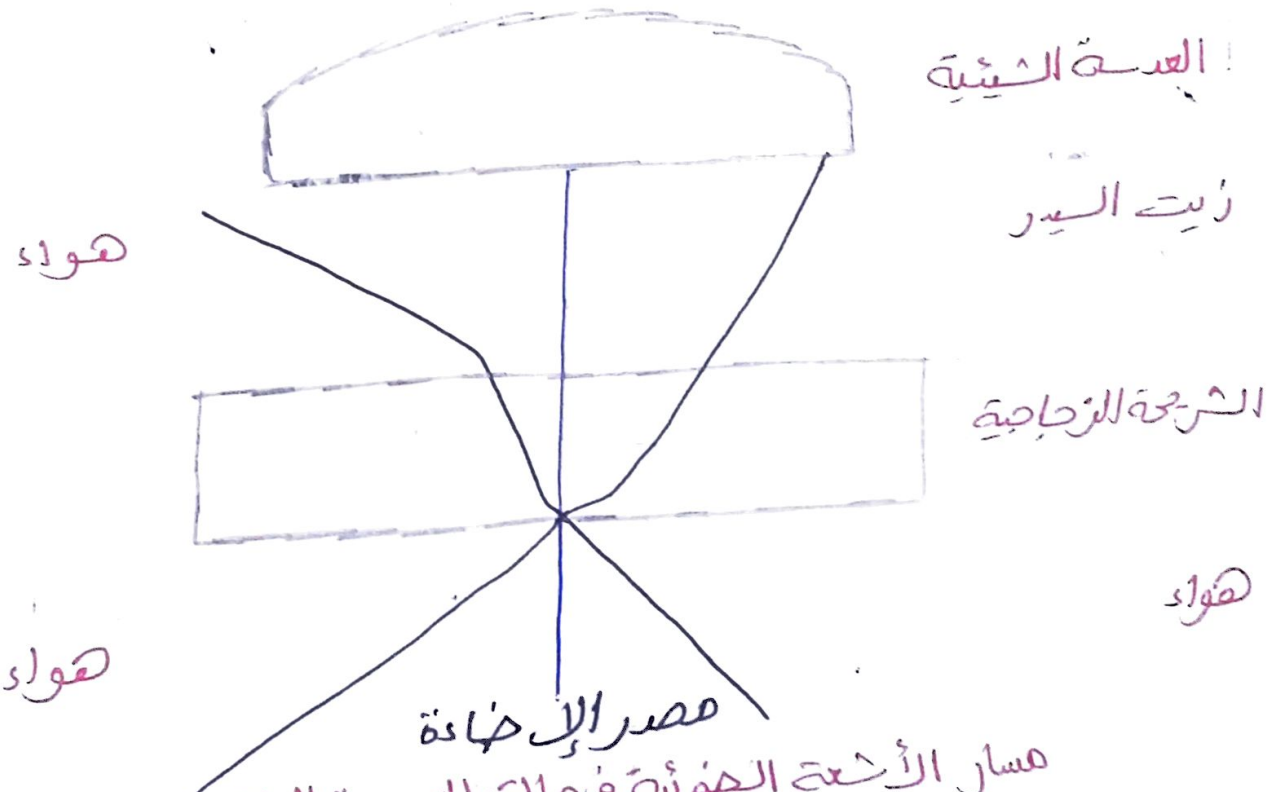
- القاعدة ← المكان اللي يستقر عليه
- الذراع ← أحمل عليه الميكروسكوب
- المسرح ← أحط عليه الشريحة
- المعدل التقريبي (الخابط الكبير) ← بحرك المسرح
- المعدل الدقيق (الخابط الصغير) ← بثبت توضيح الصورة

الأجزاء البصرية

- المرآة ← تقوم بعكس الضوء
- المكثف ← تكثيف الضوء علشان يدخل خلال العدسة
- الجهاز المكبر
  - العدسة العينية ← ملاحقة للعينيه
  - العدسة الشيئية ← ملاحقة للشريحة
    - العدسة الجافة
      - العدسة الصغرى
      - العدسة الكبرى
    - العدسة الزيتية المغمسة ← لازم أحط زيت على الشريحة

قوة تكبير الميكروسكوب = قوة تكبير العدسة العينية X قوة تكبير العدسة الشيئية

نوع العدسة الشيئية	قوة تكبير العدسة	قوة الإضاءة	وضع المكثف	فتحة الحجاب الحاجز
العدسة الصغرى	8- 10 X	ضعيفة	لأسفل	أصغر فتحة ممكنة
العدسة الكبرى	40- 45X	متوسطة	في المنتصف	نصف فتحة
العدسة الزيتية المنغمسة	90- 100X	قوية	لأعلى	مفتوح تماماً



مسار الأشعة الضوئية في حالة العدسة الجافة والزيتية

لماذا يستخدم زيت السيدر عند فحص الأغشية المصبوغة بالعدسة الزيتية؟
لأن معامل انكسار الضوء في الزيت يماثل معامل انكسار الضوء في الزجاج مما يمنع انكسار الضوء عند خروجه من الشريحة وبذلك يعمل على تجميع الأشعة الضوئية النافذة على العدسة الشيئية (العدسة الزيتية المنغمسة)

الملاحظات

- معامل انكسار الضوء في الزجاج مختلف عن معامل انكسار الضوء في الهواء وبالتالي يتشتت الضوء للخارج
- تستخدم العدسة ذات تكبير ١٠٠ للبكتيريا المصبوغة
- تستخدم الصبغة على شكل البكتيريا وحتى لما فيه صبغة لازم عدسة زيتية ولايمكن أن تكون جافة

طرق صبغ الميكروبات

الصبغ البسيط	الصبغ المركب
يستخدم به نوع واحد من الصبغة	يستخدم به أكثر من نوع من الصبغة
الأهمية البكتيريولوجية: دراسة الشكل المورفولوجي للخلايا الميكروبية	الأهمية البكتيريولوجية: تعتمد على الطريقة المستخدمة

الصبغ البسيط

صبغة أحمر الفوكسين

- صبغة حامضية قوية
- مدة الصبغ من ٥ ثوان إلى 1 دقيقة
- لا تستخدم في صبغ البكتيريا العالقة في وسط قابل للتلون

صبغة أزرق الميثيلين

- صبغة قاعدية ضعيفة
- مدة الصبغ من 3 إلى 5 دقائق
- تستخدم في صبغ البكتيريا العالقة في وسط قابل للتلون

(الليبد)

يتطلب الفحص الميكروسكوبي للبكتيريا الآتي

١- تحضير الغشاء وتثبيته
٢- صبغ الغشاء
٣- فحص الغشاء بالعدسة الزيتية

الخطوات تفصيلاً كالآتي

١- تعقيم الإبرة ذات العقدة في لهب بنزن مع مراعاة حيز التعقيم 15 سم
٢- غسل الشريحة وتجفيفها وامرارها على اللهب للتخلص من أثر الدهون
٣- اضافة نقطة ماء بالإبرة على الشريحة
٤- ثم تعقيم الابرة مرة اخرى
٥- ثم وضعها داخل الأنبوبة المحتوية على البكتيريا فالأسفل تماماً
٦- الخروج بجزء من البكتيريا ودهكه وتوزيعه على نقطة الماء على الشريحة
٧- التجفيف على لهب بنزن (الشريحة)
٨- صبغ الغشاء ← غمره بصبغة أحمر الفوكسين لمدة دقيقة
← // // أزرق الميثيلين لمدة كدقائق
٩- ازالة الزيادة من الصبغ في حوض الصبغ
١٠- غسل الشريحة بتيار خفيف من الماء
١١- تجفيف الشريحة باستخدام اللهب المباشر
١٢- وضع زيت السيدر على الشريحة وفحص الغشاء بالعدسة الزيتية.

النماذج الجانبية ← الصور من الـ PDF ص ١١١ الى ١١٧

١ Bacillus subtilis
خلايا عصوية طويلة في سلاسل متجرثمة بجرثومة وسطية
مصبوغة بصبغة أحمر الفوكسين

٢ Escherichia Coli
خلايا عصوية قصيرة مفردة غير متجرثمة - مصبوغة بصبغة أحمر الفوكسين

٣ Micrococcus SP.
خلايا كروية مفردة أو في تجمعات غير منتظمة - مصبوغة بصبغة أحمر الفوكسين

٤ البكتريا الخيطية Actinomycetes
خيوط (هيفات) طويلة رفيعة متفرعة غير مقسمة بجدر عرضية تتكاثر بالكونيديا - مصبوغة بأحمر الفوكسين

٥ الفطريات الخيطية Fungi (molds)
خيوط (هيفات) طويلة عريضة متفرعة مقسمة بجدر عرضية تتكاثر بالكونيديا - مصبوغة بأحمر الفوكسين

٦ Saccharomyces cerevisiae (Yeast)
خلايا بيضاوية كبيرة مفردة أو في تجمعات غير منتظمة تتكاثر بالتبرعم
تصبغ بأحمر الفوكسين أو أزرق الميثيلين

انتشار البكتيريا في الطبيعة

تنتشر البكتيريا في الطبيعة انتشاراً واسعاً وذلك
- صغر حجمها حيث يسهل حملها بالهواء
- سرعة تكاثرها حيث تتواجد بأعداد كبيرة
- تنوع احتياجاتها الغذائية

ومع ذلك هناك أماكن محدودة خالية من البكتيريا هي
- داخل الصخور وداخل البراكين النشطة
- الأعماق البعيدة من التربة
- الأنسجة الداخلية للحيوانات الحية والنباتات

س/ تستخدم صبغة أزرق الميثيلين في صبغ البكتيريا العالقة في وسط قابل للتلون (اللبن)

لأن صبغة أزرق الميثلين تلون الخلايا ولا تلون الوسط فنستطيع أن نميزها

دراسة حركة البكتيريا
wetmount

حركة البكتيريا MoTiLiTy of bacteria

الغرض منها التحقق من حركة الميكروبات حيث أن بعض الميكروبات لها القدرة على الحركة وهي التي تمتلك أعضاء الحركة

الفلاجيلا Flagella ومفردها Flagellum والبعض الآخر لا يمتلك أعضاء حركة وبالتالي فهو غير متحرك

طريقة عمل الشريحة

1. نظف الشريحة الزجاجية
2. اغسل غطاء الشريحة (cover) بالماء وجففه جيداً
3. ضع الـ cover في وضع أفقي على سطح نظيف
4. رج المزرعة السائلة جيداً بين راحتي اليد لضمان توزيع الخلايا البكتيرية
5. عقم إبرة التلقيح ذات العقدة وخذ من المزرعة العقدة الواحدة وذلك (لضمان تبريد الإبرة حتى تتبقى الميكروبات حية) وتوضع النقطة في منتصف الشريحة الزجاجية
6. ضع الـ cover على الشريحة الزجاجية بحيث يكون ملاحق للنقطة
7. تفحص النقطة wetmount بالميكروسكوب الضوئي

لـ حيث يتم وضع زيت سيدر على الـ cover ويتم فحص حركة البكتيريا بالعدسة الزيتية (100X)

سكشن ميكرو (٩)

- المعدة والرئة والكبد والمثانة في الشخص السليم خالية من البكتيريا على عكس الأمعاء يوجد بها بكتيريا

تمرين رقم (١)

اختبار مدى انتشار البكتيريا في الهواء ~~والـ~~ والتراب والجلد

الأدوات المطلوبة

١- عدد 2 أنبوبة آجار مغذى عميق معقم
٢- عدد 2 طبق بترى معقم
٣- حمام مائى
٤- ترمومتر

الخطوات

(١) يتم 1 سالة 2 أنبوبة بيئة آجار مغذى عميق على 100°م في حمام مائى
(٢) ثم يتم تبريدها عن طريق ملء نصف الكوب (حمام مائى) بمياه ساقعة لأنه لا يجب استخدام الآجار وهو ساخن
(٣) يتم صب الآجار في الأطباق بجوار اللهب ويتم تحريك الأطباق دوياً ونترك الأطباق حتى يتجمد الآجار
(٤) واحد نسيبه شوية مفتوح بعيد عن اللهب لمدة 15 دقيقة ويكتب عليه هواء والآخر نقسمه إلى قسمين ويكتب على أحدهما تراب والآخر جلد
(٥) لـ قسم الجلد نخطط بصابع اليد بعد غسلها في سطح البيئة في النصف المكتوب عليه جلد
أما القسم المكتوب عليه تراب ~~فبأى~~ امرار قطعة من القطن أو القماش على البنش ثم امراره في

(٦) الطبق الأولانى الى كان مكتوب عليه هواء نغلقه يقى ثم نقوم بعملية التحضين على 30°م لمدة 48-72 ساعة
والطبق الأخر نقوم بعملية التحضين أيضاً
- بعد التحضين تتكون مستعمرات Colonies يمكن رؤيتها بالعين المجردة نتيجة لتكاثر الميكروبات وتكون عدد كبير من الخلايا

الصبغ المركب

الصبغ بطريقة جرام
Gram-Staining Procedure

اكتشفها العالم الدنماركي ChristianGram سنة 1884 عند صبغة للأنسجة المحايدة ببعض البكتيريا حيث تأخذ الأنسجة لون بني خفيف Brownish والبكتيريا لون بنفسجي غامق

- واتضح أن استخدام صبغة الجنيان البنفسجي مع اليود يكون داخل الخلايا معقد بنفسجي لا يزيله الكحول والأسيتون هو البكتيريا الموجبة لجرام G+ على عكس البكتيريا السالبة لجرام G-

خطوات صبغة جرام

① غمر الغشاء بصبغة الجنيان البنفسجي لمدة دقيقة
② إزالة الزيادة من الصبغة حوض الصبغ
③ غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء
④ غمر الغشاء باليود لمدة دقيقة
⑤ إزالة الزيادة من اليود في حوض الصبغ
⑥ غسل الغشاء بالكحول 95% تساقط قطرات خالية من الصبغة

⑦ غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء
⑧ غمر الغشاء بصبغة أحمر الفوكسين لمدة 1 دقيقة
⑨ إزالة الزيادة من ↑ ⑩ غسلها غسل الشريحة بتيار هادئ من الماء
⑪ تجفيف الغشاء باستخدام لهب مباشر

من تكتسب لون صبغة أحمر الفوكسين تسمى G-	التي تحتفظ باللون البنفسجي تسمى G+

و يفسر ذلك بعض النظريات

النظرية الأولى (الاختلاف في تركيب الجدار) (الأدق)

جدار البكتيريا +G به نسبة عالية من مركب Peptidoglycan وبه نسبة منخفضة من الدهون

أما في البكتيريا -G به نسبة أعلى من الدهون وبالتالي فإن المعاملة بالكحول تعمل على إذابة الدهون في جدار البكتيريا -G مما يُفتح فتحات كبيرة يخرج منها معقد الصبغة، بينما تكون فتحات صغيرة في جدار البكتيريا +G لا يخرج منها المعقد

النظرية الثانية

تختلف التركيب الكيميائي لبروتوبلازم الخلايا +G ، -G حيث يتكون معقد من الجنسيان والبوتاسيوم بروتوبلازم الخلايا فتحتفظ +G باللون البنفسجي ولا يتكون هذا المعقد مع الخلايا -G

الأهمية البكتيريولوجية لصبغة جرام

1. تستخدم في تقسيم البكتيريا إلى نوعين
   - G-
   - G+
2. تستخدم في الكشف عن فعالية المزارع البكتيرية
3. تستخدم في تشخيص بعض الأمراض

ويمكن تلخيص الفرق بين G^+ و G^-

البكتيريا الموجبة G^+	البكتيريا السالبة G^-
١) طبقة الببتيدوجليكان سميكة	١) // //// رفيعة
٢) لا يوجد طبقة خارجية	٢) يوجد طبقة من الفوسفوليبيد "دهون"
٣) تحتفظ بالمعقد ولا تتأثر بالكحول	٣) لا تحتفظ بالمعقد ويزيل الكحول اللون وتصبح شفافة
٤) تحتفظ باللون البنفسجي	٤) تكتسب لون صبغة أحمر الفوكسين

الهدف من دراسة المجاميع ~~الميكروبية~~ البكتيرية

← فصل وتنقية وتميز وتصنيف الميكروبات "صفات المجموعة مميزة للنوع"

دراسة ووصف المجموعات البكتيرية

١) دراسة بالعين المجردة

١) الشكل الخارجي from ← دائري - مغزلي - قوقعي - جذري - خيطي - أهليجي

٢) الإرتفاع Elevation ← مسطح - مرتفع - مدرج - محدب - مقعر

٣) اللون Colour ← أصفر - وردي - كريمي

٤) القوام Consistency ← مائي - لزج - ثقيل - يابس

٥) الإنتشار Spread ← منتشرة - محددة

٦) الشفافية Transparency ← شفافة - نصف شفافة - معتمة

٢) دراسة بالميكروسكوب بإستخدام العدسة الصغرى (10x)

١) الحافة Margin

(كاملة - ممزقة - متموجة - مفصصة - هدبية)

٢) التركيب الداخلي Internal structure

(حبيبي - شبكي - متراكم - مجعد - مشعع)

من ص 141 إلى ص 165

قراءة من الـ PDF

طرق تنمية البكتريا اللاهوائية

مبدئياً تنقسم الميكروبات تبعاً لاحتياجاتها الهوائية



① هوائية حتماً obligate aerobes
تحتاج للأكسجين في نموها مثل ← Bacillus sp.



② لاهوائية حتماً obligate anaerobe
تنمو في غياب الأكسجين مثل ← Clostridium sp.



③ اختيارية Facultative anaerobes
تنمو في وجود أو غياب الأكسجين مثل ← Micro Coccus sp.

④ حساسة الاضاج للأكسجين Microaerophilic
تنمو في وجود تركيز منخفض من الأكسجين مثل ← Campylobacter sp.



البكتريا اللاهوائية : نوع من البكتريا
تنمو في غياب الأكسجين ووجوده في البيئة
يؤدي وجوده الى تثبيط نموه أو قتل هذه البكتريا

طرق تنمية البكتريا بعيداً عن الأكسجين

① تنمية ميكروب لاهوائي مع آخر هوائي بغرض استهلاك O_2
② اختصاره بواسطة المواد الكيميائية
③ حجز البيئة عن الأكسجين باستخدام ألفا سبر
④ الوخز في آجار الجلوكوز العميق
⑤ المزرعة المهتزة
⑥ ادلال غاز خامل محل الأكسجين

① تنمية ميكروب لاهوائى مع أخر هوائى بغرض استهلاك O_2

① احضار طبقين وتخطيط أحدهم بميكروب هوائى والآخر بميكروب لاهوائى

② لصق الطبقين بالصلصال لمنع دخول الأكسجين ثم التحضين

③ بعد التحضين ستنمو البكتيريا الهوائية لوجود الـ O_2 قبل غلق الأطباق

④ سيبدأ استهلاك O_2 داخل الطبق وتبدأ البكتيريا اللاهوائية بالنمو

② امتصاص الـ O_2 بواسطة المواد الكيمائية

① تلقيح آجار مائى بالبكتيريا

② وضع قطنة مشبعة بحمض بيروجاليك اسيد "يمتص الأكسجين داخل الأنبوبة" و $NaOH$

③ وضع CO_2 فى الأنبوبة عن طريق وضع سدادة قطنية محروقة

④ وضع سدادة فلين أو كاوتشوك لمنع دخول الهواء ثم التحضين والظروف داخل الأنبوبة تكون لاهوائية

ازاى بقى نعرف هل الميكروب هوائى أو لاهوائى

① احضار أنبوبة أخرى عادية ملقحة مع الأنبوبة الأولى

② لو الميكروب نما فى الأنبوبة الأولى اذا الميكروب لاهوائى

لو // // // الثانية // // هوائى

// // // فى الأنبوبتين // // اختيارى

③ حجز البيئة عن الأكسجين باستخدام الفاسبر

① احضار بيئة بويون جلوكوز سائلة والغلى فى حمام مائى لمدة ١٥ دقائق ثم التبريد. لطرد الأكسجين الذائب

② تلقيح البيئة وتغطيتها بالفاسبر يعمل كطبقة عازلة للأكسجين

③ تصبح البيئة لاهوائية وإذا نما ميكروب يكون لاهوائى

الرسم من الـ PDF

④ الوضع في آجار جلوكوز عميق "البيئة حلبة"
① احضار آجار جلوكوز عميق وبالغلي في حمام مائي لمدة ١٥ دقائق ثم التبريد لتجمد
② تلقيح الميكروب بالوخز بإبرة مستقيمة ثم التحضين
الحرف الـ PDP

⑤ المزرعة المختبرة البيئة مميلة
نفس فكرة آجار جلوكوز عميق
لكن نستخدم ابرة ذات عقدة
⑥ احلال غاز خامل محل الأكسجين (جهاز ما كنتوش)
① تلقيح المزارع ووضعها في الجهاز
② التأكد من خلو الجهاز من O_2 واحلال غاز H_2 و CO_2 محل O_2
③ قفل الصمامات وتشغيل المولد الكهربي ثم تحضين الجهاز
④ للتأكد من أن الظروف داخل الجهاز لاهوائية يتم وضع أنبوبة دليل أوكاشي بها "جلوكوز - NaOH - صبغة أزرق الميثيلين" اذا أصبحت الصبغة عديمة اللون أي أنه تم اختزالها تكون البيئة لاهوائية واذا لم تختزل الصبغة وظلت زرقاء تكون البيئة هوائية

من ١٨٠ حتى ١٨٧ من الـ PDP

من ص 161 إلى ص 165 في السكشن الرابع

عزل البكتيريا وتنقيتها

الهدف من العزل: تتواجد الميكروبات في الطبيعة عادة بصور مختلطة إلا في (حالة المرض - المزارع النقية) لذلك يجب عزلها للحصول على مزارع نقية أي تحتوي على نوع واحد فقط

أهمية العزل: دراسة كل نوع من الخلايا البكتيرية في صورة منفردة لتميز صفاته وخواصه

طرق العزل

1. طريقة الأطباق المصبوبة — Pour Plate Method
2. // // المخطوطة — Streak Plate Method
3. // التخفيف — Dilution Method

1. طريقة الأطباق المصبوبة

فكرة عملها: تعتمد على تخفيف الخلايا التي تحملها عقدة إبرة التلقيح بنقلها عدة مرات مع المزج الجيد في بيئة الآجار المغذي العميق (المسيل) ثم صبها في الأطباق ثم التحضين فتتموضع خلية منفردة مكونة لمزرعة نقية

الأدوات المحلولية

1. مزرعة بويون مختلطة تحتوي على ميكروبي
Micrococcus sp. + Escherichia coli (X)
2. عدد 3 أنابيب بيئة آجار مغذي عميق
3. // 2 أطباق بترى معقم
4. حمام مائي
5. ترمومتر
6. إبرة تلقيح ذات عقدة

طريقة العمل

1. صهر بيئة الآجار المغذى على 100 م° ثم تبريده إلى 50 - 55 م°
2. ترج المزرعة المختلطة جيداً بين راحتي اليد ثم تعقم إبرة التلقيح لدرجة الإحمرار وتؤخذ عقدة وتوضع في أنبوبة الأجار المغذى العميق رقم 1 وترج جيداً
3. تعقم إبرة التلقيح للمرة الثانية وتؤخذ عقدة من أنبوبة الأجار المغذى العميق رقم 1 وتنقل لأنبوبة الأجار المغذى العميق رقم 2 وترج جيداً
4. تعقم إبرة التلقيح للمرة الثالثة وتؤخذ عقدة من أنبوبة الأجار المغذى العميق رقم 2 وتنقل لأنبوبة الأجار المغذى العميق رقم 3 وترج جيداً

- يتم تعقيم إبرة التلقيح بين كل خطوة والتالية لها.

5. تصب الأنبوبة 2 و3 في طبقين بتري معقمين مكتوب عليهم 2 و3 وترج الأطباق بشكل رحوي (لضمان توزيع بيئة الأجار المغذى الملقحة فيهما)
6. تحضين الأطباق مقلوبة على 37 م° لمدة 48 ساعة

- يجب مراعاة شروط التعقيم وإجراء كل الخطوات بجوار اللهب

من ~~[illegible]~~

← 161 إلى 165