الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية الأولى

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 - 2021

الأدوات والأجهزة في المختبر

Tools and Equipment in the Laboratory

- **مقدمة:**

علم الأحياء الدقيقة Microbiology هو العلم الذي يختص بدراسة الكائنات الحية الدقيقة وأنواعها وأشكالها وأضرارها وفوائدها ودورة حياتها وأماكن وجودها فهي موجودة في كل مكان، وقد سميت حية لأنها تقوم بجميع الوظائف الحيوية كالتنفس والتكاثر، وسميت دقيقة لأنها صغيرة الحجم لا ترى بالعين المجردة بل مجهرياً فقط، وتتفاوت في أشكالها وأحجامها وأنواعها خمسة هي:

الجراثيم Bacteria، الفطريات Fungi (الأعفان Molds – الخمائر yeast)،

الفيروسات Viruses، الطفيليات Parasites، الطحالب Algae.

1- الفيروسات Viruses: كائنات أولية دقيقة جداً تسبب أمراضاً للإنسان والحيوان والنبات والبكتيريا، وهي طفيليات إجبارية تنمو في داخل خلايا الكائنات الحية فقط.

2- الجراثيم Bacteria: عبارة عن خلايا وحيدة مجهرية الحجم يوجد منها حوالي 1500 نوع أو أكثر منتشرة في البيئات الطبيعية.

3- الفطريات Fungi: هي كائنات خالية من الكلوروفيل غير قادرة على صنع غذائها وتعتبر كائنات عديدة الخلايا لكنها لا تتكون من جذور وسيقان وأوراق، ويتراوح حجمها من خلية مفردة مجهرية مثل الخميرة Yeast إلى خلايا متعددة ضخمة مثل الأغاريكس (المشروم).

4- الطحالب Algae: نباتات بسيطة منها وحيدة الخلية (الأولية)، بينما تتجمع الطحالب الأخرى على شكل مجموعات تحتوي على الكلوروفيل ولها القدرة على القيام بعملية التمثيل الضوئي، وتوجد الطحالب غالباً في البيئة المائية أو في التربة الضحلة.

5- الطفيليات Parasites: تضم قسمين هما الأوليات Protozoa، والديدان Helminths.

يجري استخدام علم الأحياء الدقيقة في شتى مناحي الحياة بطريقة مباشرة أو غير مباشرة مثل: إنتاج المضادّات الحيويّة Antibiotics، والمواد الصناعية مثل الإنزيمات والأحماض العضوية والكحول والفيتامينات إضافة إلى إنتاج وتطوير اللقاحات (التطعيم) Vaccines، واستخدامات في الصناعات الغذائية (إنتاج الجبن بأنواعه ومشتقات الحليب الأخرى)، والصناعات العسكرية (الأسلحة البيولوجية Biological weapons) كذلك استخدام بعض الأنواع للقضاء على أنواع غير مرغوب فيها مسببة أمراضاً للإنسان والمحاصيل، والقضاء على الفضلات والملوثات، وتساعد علماء الهندسة الوراثيّة في فهم طبيعية الحمض النووي DNA وRNA، وللأحياء الدقيقة دور مهم في تخصيب التربة (تثبيت النتروجين)، وتحويل المادة العضوية المعقدة إلى مركبات بسيطة.

التوصيات والملاحظات الواجب إتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة

يتعرض العاملون في حقل الأحياء الدقيقة إلى خطر الميكروبات الضارة والممرضة لذلك يجب إتباع الاحتياطات اللازمة في مراحل العمل كافة فالنظافة والتعقيم وتنفيذ التجارب بدقة من الأمور الأساسية في عملي الأحياء الدقيقة، وإن أي إهمال في تهيئة مكان العمل والأدوات والمواد المستعملة للتجربة سيؤدي إلى نتائج خاطئة ويعرض الطالب إلى الخطر.

هناك بعض الملاحظات والتوصيات التي يجب مراعاتها وإتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة منها:

1- ارتداء المعطف الأبيض قبل البدء بالعمل، ويجب تعقيمه فوراً في حال تلوثه كما يجب عدم إخراجه من المختبر إلا في نهاية الفصل بعد تعقيمه (إن أمكن ذلك).

2- تغطية شعر الرأس مع الأنف والفم بقناع قماشي، وارتداء القفازات.

3- غسل اليدين قبل الخروج من المختبر بالماء والصابون أو بمحلول مطهر، والعناية بنظافة الأظافر على أن يراعى عدم استخدام قطع الصابون الصلبة في تنظيف الأيدي في المختبر كي لا تكون عاملاً لنقل الجراثيم من شخص لآخر، ويستعاض عنها بالصابون السائل، وعدم استخدام المناشف القماشية التي تستخدم لأكثر من مرة ويستعاض عنها باستخدام مناشف ورقية تستخدم لمرة واحدة.

4- عدم وضع الدفاتر والكتب على المنضدة، وعدم التدخين والأكل داخل المختبر.

5- عدم استعمال الماصات التي تحتاج استعمال الفم بل يجب استعمال أدوات سحب يدوية.

6- تنظيف المكان قبل البدء بالعمل وبعد الانتهاء منه بالماء المضاف إليه قليلٌ من ماء جافيل لأن النظافة أمر ضروري جداً لنجاح العمل الجرثومي، ويجب أن يكون مكان العمل طاولةً ملساءَ مقاومةً للحموض والأسس والحرارة.

7- تجنب تلوث اليدين أو المنضدة أو حوض الغسيل بالجراثيم والصبغات المستعملة للتلوين.

8- عدم سكب الأوساط الغذائية أو رمي القطن وعيدان الثقاب في أحواض الغسيل إنما وضعها في سلة المهملات أو الأمكنة المعدة لذلك.

9- تجنب كل ما من شأنه الإخلال بنظام ونظافة المختبر والمحافظة عليه نظيفاً مرتباً باستمرار.

10- إعلام المشرف على الجلسة العملية عند حدوث أي كسر بالأدوات أو عطل في الأجهزة أو تعرّض أحد لجرح ما أو حدوث تلوث .....الخ.

11- قراءة التعليمات الخاصة بالتجربة قبل إتباع مراحل إجراء التجربة.

12- عدم البدء بأيِّ تجربة قبل التأكد من وجود المواد والتجهيزات والأدوات الضرورية لها كافة.

13- عدم وضع إبَرِ التلقيح على المنضدة ووضعها دائماً على حاملها الخاص أو إبقائها في اليد عند الاستعمال والانتباه إلى تعقيمها قبل أي استعمال وبعده.

14- الحذر عند استعمال الغاز وعدم تركه مفتوحاً بلا داع.

15- عدم إخراج المزارع الجرثومية خارج المخبر على الإطلاق.

16- عند ترقيم الأطباق والأنابيب تستعمل أقلام خاصة لذلك أو تستعمل أوراق اللصق الخاصة مع الانتباه إلى عدم لصق هذه الأوراق باللسان بل لصقها بقطرة من الماء. يجب تجنب وضع الأقلام في الفم خوفاً من العدوى بالجراثيم.

17- تتم جميع مراحل التجربة في جو عقيم تماماً ضمن غرف زرع جرثومية خاصة.

18- اربط أطباق بتري بشريط لاصق واكتب عليها اسم المجموعة، والتجربة، وضع الأنابيب الخاصة بمجموعتك في علبة خاصة، واكتب عليها اسم المجموعة واسم التجربة واسم المقرر، ثم ضع الأطباق والأنابيب في الحاضنات المعدّة لذلك.

19- عند استعمال المجهر وللحفاظ عليه خاصة العدسات يجب إتباع التعليمات الآتية:

- لا تلمس العدسات باليد، وإذا كانت متسخة امسحها برفق باستخدام الورق الناعم الخاص لذلك، ولا تترك شيئاً على المجهر في حال عدم استخدامه، واحفظ المجهر بعيداً عن الغبار والسوائل، واتركه دائماً على العدسة ذات التكبير الأقل.
- أزل زيت الأرز بمسحه بكمية قليلة من (الزيلول) غول الخشب Xylol مباشرة عند انتهاء استخدامك للعدسة الغاطسة لأن تجمّد زيت الأرز على عدسة المجهر يقتضي استخدام المحلات القوية مثل الزيلول لحلّه، ويمكن أن يؤدي الاستخدام الكثيف لهذه المادة إلى حلّ المادة اللاصقة للعدسات.
- لا تحرك المجهر أثناء استخدامك لزيت الأرز لأن سقوطه على الأجزاء الميكانيكية أو المكثف وتركه دون تنظيف يعيق حركة المجهر مستقبلاً بسبب الزيت المتجمد والغبار.

20- سجل ملاحظاتك مباشرة وقدمها بتقرير للأستاذ المشرف يحتوي على المعلومات التالية:

الاسم والفئة، اسم التجربة وهدفها، ملخص طريقة العمل، النتائج والمناقشة، الخلاصة.

- **تنظيف الأدوات الزجاجية المستعملة:**

تزال جميع العلامات والكتابة المدونة على الأدوات الزجاجية، ثم توضع الأدوات الزجاجية المحتوية على المزارع الجرثومية في الصاد الموصد Autoclave (المعقام) عند درجة حرارة 121°م وضغط 15 ليبرة/إنش^2 لمدة 15– 20 دقيقة، وذلك لقتل الجراثيم وإسالة الوسط الغذائي الصلب، ثم تؤخذ ساخنة وتفرّغ من محتواها وتغسل حسب ما يلي:

1 – الأنابيب الزجاجية:

تغسل بالماء والصابون باستعمال فرشاة خاصة، ثم تشطف بالماء المقطر جيداً وتوضع مقلوبة في السلال المعدنية الشبكية الخاصة.

2 – أطباق بتري:

تغسل أطباق بتري الزجاجية بالماء والصابون بعد تفريغ محتوياتها، ثم تُغسَل بالماء المقطر جيداً، وتوضع مقلوبة في المكان المخصص لها. تعقم أطباق بتري البلاستيكية المستخدمة بالصاد الموصد ضمن أكياس خاصة متحملة للحرارة حيث يتم إتلاف الجراثيم بداخلها قبل أن ترمى.

3 – الصفائح الزجاجية:

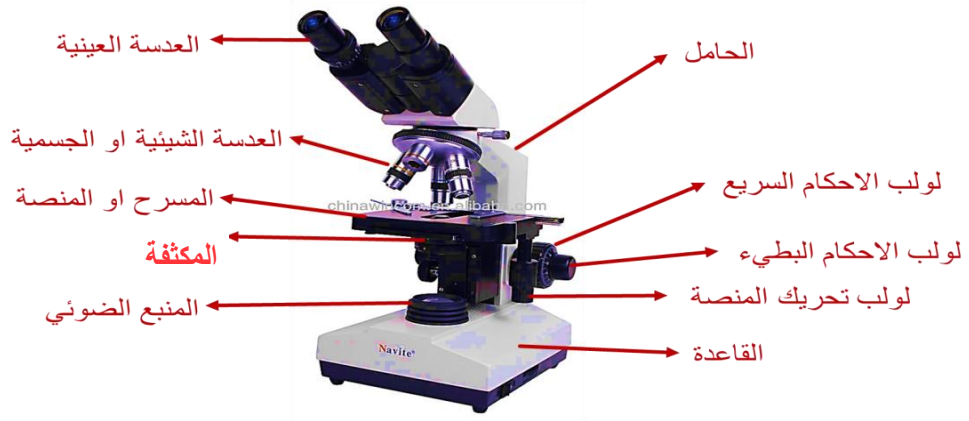
توضع الصفائح المستعملة في إناء حاوٍ على الماء والصابون، وتغسل كل واحدة منها بفرشاة خاصة وباستعمال صابون خشن لإزالة المواد الباقية عليها، ثم تشطف بالماء المقطر جيداً، وتجفف ثم تحفظ في صناديقها الخاصة. قبل الاستعمال تمسك الصفيحة الزجاجية وتُعْرَضُ على اللهب للتأكد من جفافها وحرق ما تبقى على سطحها.

4 – الماصات:

تختلف طرق تنظيف الماصات باختلاف المواد التي تحتوي عليها، وكثيراً ما تنظف بالماء والصابون، ثم تشطف بالماء المقطر كالأدوات السابقة أما عند احتوائها على مواد دهنية كالحليب مثلاً فتغسل بالماء والصابون أولاً، ثم توضع في إناء طويل يحتوي على محلول منظّف مؤلف من 25 غ كرومات الصوديوم الثنائية و1000 مل من حمض الكبريت الممدد بحيث يكون الطرف المدبب إلى الأسفل، وبعد ذلك تغسل جيداً بالماء المقطر ثم تجفف وتعقّم وتحفظ للاستعمال.

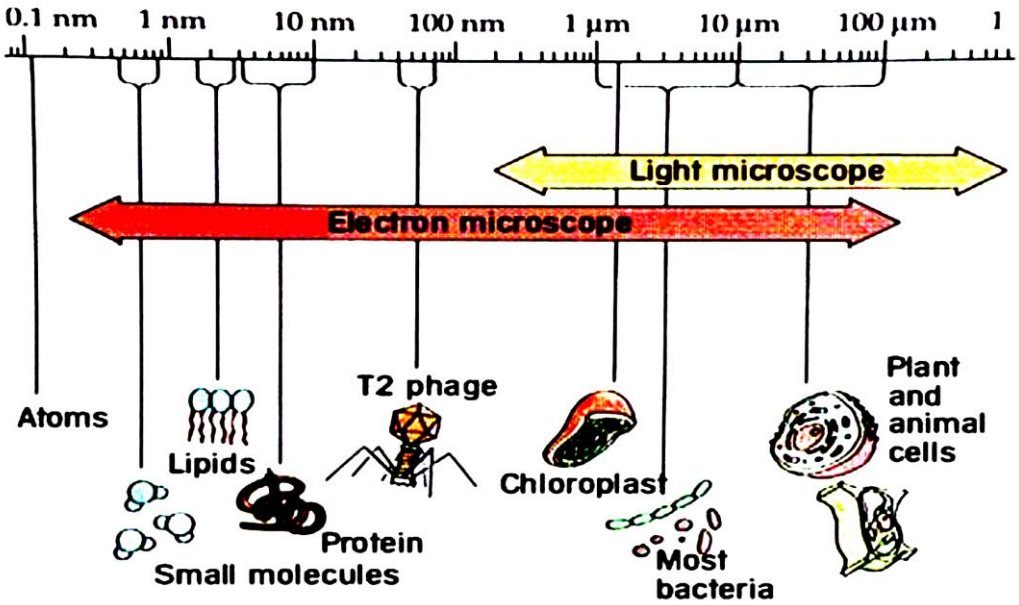
المجاهر Microscope

يجري استخدام أنواع متعددة من المجاهر في دراسة الأحياء الدقيقة تختلف باختلاف تركيبها والغرض من استخدامها مثل المجهر الضوئي، والمجهر ذو الساحة المظلمة، والمجهر متباين الأطوار، ومجهر الأشعة فوق البنفسجية، والمجهر الفلورسيني، والمجهر الالكتروني الناقل، والمجهر الالكتروني الكانس أو الماسح، ومجهر المسح النفقي، ومجهر القوة الذرية.



استخدام المجهر الضوئي Light Microscope:

يستخدم لدراسة الأحياء الدقيقة غير المرئية بالعين المجردة. إنَّ حدود الرؤيا بالعين المجردة تساوي 0.1 ملم بينما تصبح بحدود 0.2 ميكرومتر باستعمال المجهر الضوئي (الشكل 1).



الشكل (1): الأبعاد التي يمكن تمييزها بالمجهر الضوئي والمجهر الالكتروني.

• أجزاء المجهر:

1- جملة الهيكل: تتألف من قاعدة المجهر مع العماد، وقرص دوار يحمل العدسات الجسمية، ورف المجهر الذي يحمل الشريحة والجسم المدروس، والملقط، واللوالب.

2- جملة التكبير: تشمل العدسات العينية القريبة من عين الفاحص تكبير كل منها 10 أو 15 إكس، والعدسات الجسمية مثبتة على القرص الدوار تكبيرها 4 إكس، 10 إكس، 40 إكس، 100 إكس. العدسة الغاطسة لها رقم وخط ملون أطولها 100 إكس. قوة التكبير هي حاصل ضرب تكبير العدسة العينية بتكبير العدسة الجسمية.

3- جملة الإضاءة: تتكون من منبع ضوئي كهربائي يتجه من الأسفل إلى الأعلى باتجاه العينات مروراً بالمكثفة الضوئية تحت الرف، ويوجد ضمن الجملة الحجاب (الحظار) وظيفته التحكم بكمية الضوء الصادر من المنبع الضوئي باتجاه الشريحة المفحوصة زيادة أو نقصاناً، ويوجد أسفل المكثفة مرشحة زرقاء اللون لاستعمال ضوء وحيد بسيط لزيادة جودة الرؤية.

4- جملة الاحكام: لولبا الاحكام السريع لرفع وخفض رف المجهر، لولبا الاحكام البطيء للمطابقة الدقيقة، لولبا الدراجة (يمين يسار- أمام خلف) لتحريك المحضر الموضوع على رف المجهر، تتحرك العينيتان على مسطرة مدرجة اقتراباً وابتعاداً وهذا يسمى المسافة بين العينيتين، وهي قدر ثابت لكل فاحص يتيح له مشاهدة خيال واحد عند النظر إلى المحضر عبر العينيتين معاً.

• استعمال المجهر:

- الفحص بالعدسة 10 اكس المكثفة:

يجب رفع رف المجهر الحامل للمحضر المطلوب فحصه إلى أقرب ما أمكن من العدسة الجسمية 10 اكس، ثم يضع الفاحص عينيه على العدسات العينية ويبعد المحضر عن الجسمية بلولب الإحكام السريع رويداً رويدا حتى ظهور الساحة المجهرية، ثم تضبط بلولب الإحكام الدقيق ثم يوضع الشيء المفحوص في مركز الساحة.

- الفحص بالعدسة 40 اكس المكثفة في الوسط:

بعد إظهار الساحة على العدسة 10 ننزل العدسة 40 بتحريك القرص الدوار ثم تجري المطابقة.

– الفحص بالعدسة 100 اكس المكثفة والحجاب مفتوح:

توضع قطرة زيت الأرز على العدسة الغاطسة، وقد تمّ اختيار هذا الزيت لأن قرينة انكساره الضوئية معادلة لقرينة انكسار الزجاج فبوجوده تقلّ بعثرة الحزمة الضوئية فتزداد قوة التمييز التي ترفع من قوة التكبير. بعد وضع الزيت تنزل العدسة حتى تغطس برفق وتلامس سطح الشريحة المطلوب فحصها، ثم يضع الفاحص عينيه على العينيتين، ويقوم بإبعاد الشريحة عن الغاطسة باستعمال اللولب السريع حتى تظهر الساحة ومن ثم البطيء للمطابقة الدقيقة.

بعض الأجهزة والأدوات المستخدمة في مخابر الأحياء الدقيقة

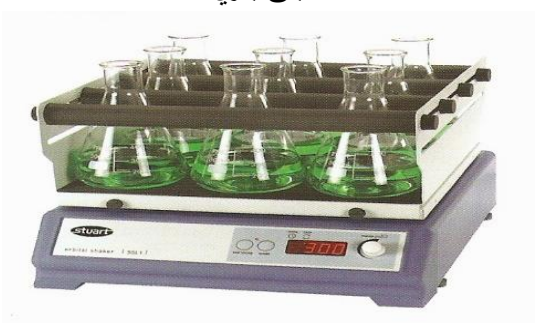
الشرائح الزجاجية

غطاء الشريحة (الساترة)

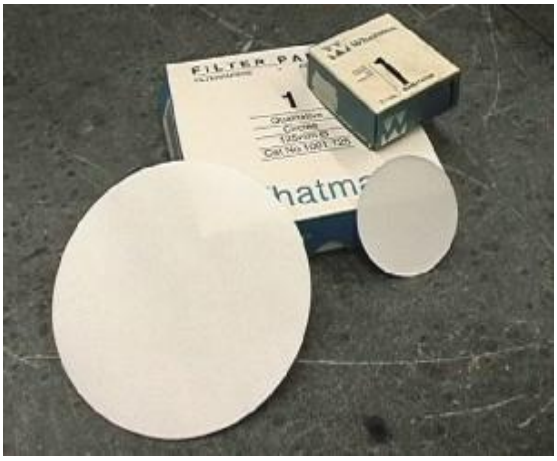
علبة الشرائح

أطباق بتري

ملاقط



جهاز رجاج آلي Shaker



ورق ترشيح

أوساط غذائية مائلة (مستنبتات)

الأرلينات

مقياس مدرج

ميزان حساس دقيق

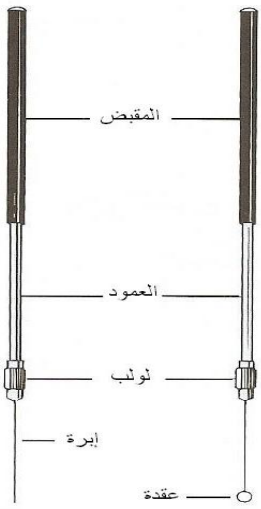
قمع ترشيح

ميزان حساس

مرشح

ورق عباد الشمس

إبرة التلقيح ومصباح لهب

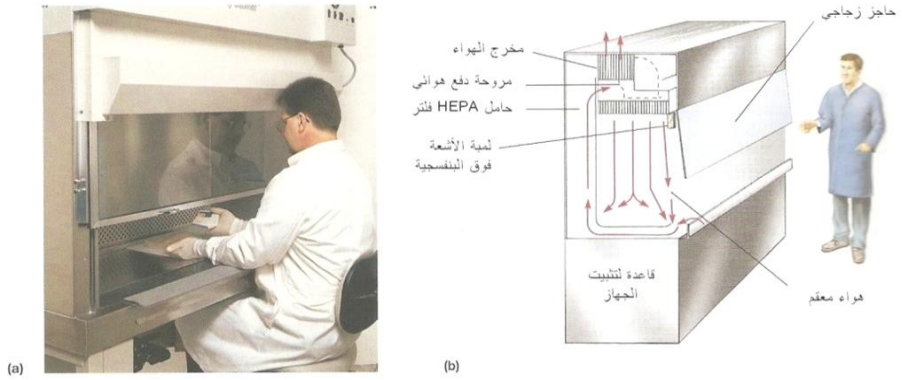


قضيب البلاتين (إبرة التلقيح)

جهاز قياس الحموضة PH

جهاز التعقيم بالهواء الجاف (فرن)

غرفة زراعة وعزل مع التعقيم بالأشعة فوق البنفسجية

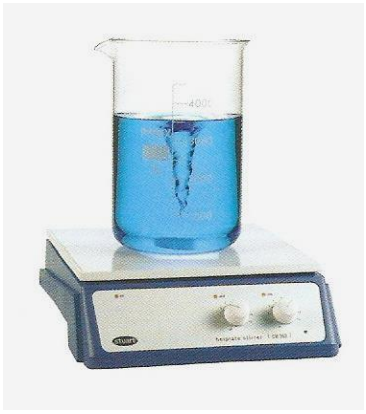


غرفة العزل (اللامنير) Laminar flow

جهاز الطرد المركزي Centrifuge (مثفلة)

حمام مائي Water-bath

جهاز تقطير الماء



محرك مغناطيسي Stirrers

الأوتوغلاف (جهاز التعقيم)

حاضنة لنمو الأحياء الدقيقة

انتهت المحاضرة