الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة الثانية عشر

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

دراسة الأحياء الدقيقة في التربة والأغذية والألبان

Study of Soil and Food and Dairy products Microbiology

أولاً- الأحياء الدقيقة في التربة:

تلعب الكائنات الدقيقة خاصة الجراثيم دوراً هاماً في دورات العناصر المختلفة، وفي خصوبة التربة بخاصة في منطقة المحيط الجذري Rhizosphere لأنها تستطيع إمداد النبات بما يحتاجه من عناصر معدنية إما عن طريق تزويد التربة بالآزوت مثلاً، أو عندما تقوم بتحليل المواد العضوية المختلفة محولة إياها إلى الصورة الصالحة لتغذية النبات، وتأخذ بالمقابل المواد السكرية الناتجة عن الرواشح الجذرية.

يجب التمييز بين النشاط الميكروبي وكثافة الجراثيم فقد يحدث أن تكون هناك علاقة ايجابية بينهما (ازدياد النشاط بازدياد العدد) لكنها ليست حالة عامة لأن هناك عدداً لا يستهان به من هذه الأحياء يمكن أن يكون في حالة ثبات لهذا تتم عدة دراسات على هذه الأحياء منها:

1- الإحصاء باستعمال الشريحة الملامسة.

2- الإحصاء باستعمال أطباق بتري.

3- تقدير المجموعات الوظيفية للأحياء.

4- الكشف عن بعض الأحياء وتحديد هويتها وخصائصها.

لدراسة الأحياء الدقيقة الموجودة في التربة وعزلها وتحديد هويتها لابد من تحليل التربة فيزيائياً وكيميائياً لمعرفة خصائص الوسط الذي تعيش فيه هذه الكائنات ولنستطيع تفسير النتائج التي نحصل عليها أما الدراسة الخاصة بالأحياء الدقيقة (الدراسة الحيوية) فتتناول عدة نواح هي:

1- التعداد العام للأحياء الدقيقة في 1 غ من التربة.

2- عزل هذه الأحياء للحصول على مستعمرات نقية للأنواع.

3- إكثار هذه الأحياء وتحديد هويتها وخواصها بغية الاستفادة من وجودها أو التخلص منها.

يعيش على سطح التربة وفي أعماق مختلفة منها عدد كبير ومتنوع من الأحياء الدقيقة (فطريات – طحالب – جراثيم – فيروسات – وحيدات خلية حيوانية .....)، ومن الطبيعي أن تؤثر هذه الأحياء في بعضها البعض من جهة، وأن تؤثر في ما يعيش في التربة من نباتات راقية وغيرها من الأحياء الكبيرة من جهة أخرى لذلك من الضروري التعرف على هذه الأحياء وتحديد أعدادها وأنواعها في التربة وكذلك يجب إيضاح العوامل المسيطرة على توزيعها، ولما كانت هذه الأحياء موجودة في ظروف فيزيائية

وكيميائية مختلفة لذلك يجب عند دراستها وتحديد نوعها وعددها والعوامل المسيطرة على توزعها معرفة نوع التربة من حيث الصفات الفيزيائية والكيميائية لذرات التربة ومعرفة العمق وأنواع النباتات المسيطرة ودرجة pH والمناخ المسيطر ...... الخ.

1- الإحصاء باستعمال الشريحة الملامسة:

تسمى بطريقة روسي- كولودني Rossi-Cholodny التي تتضمن غرس صفائح زجاجية في التربة المزروعة، ثم نزعها على فترات زمنية وتلوينها ثم فحصها بالمجهر، حيث يمكن ملاحظة علاقة الجراثيم مع بعضها وترافقها مع حبيبات التربة وجذور النباتات.

2- الإحصاء باستعمال أطباق بتري:

يوجد أكثر من طريقة لإحصاء الأحياء الدقيقة بأطباق بتري أهمها طريقتين هما:

الطريقة المباشرة (الجافة)، والطريقة غير المباشرة (الرطبة)، ويجب مراعاة ما يلي:

أ- <u>طريقة أخذ العينة</u>: حيث تراعى شروط العقامة للأدوات المستخدمة، كما يجب تسجيل جميع المعلومات عن التربة (صفاتها، لونها، مكان أخذ العينة، قربها من نبات معين أو بعدها، عمقها..الخ)

ب- <u>طرق نقل العينة</u>: يجب أن تنقل العينة مباشرة إلى المختبر، والمحافظة عليها بحالة عقيمة ويتم إجراء الاختبارات فور الوصول للمختبر إن أمكن، أو أن تحفظ العينة في البراد لحين إجراء الاختبارات، ويجب ألا تطول مدة الحفظ عن عدة أيام.

1- الطريقة الجافة المباشرة:

نأخذ 1غ من التربة الخصبة بوساطة ملعقة معقمة ثم ترش بحالة طاهرة على سطح طبق بتري حاوي على وسط مغذي معقم، أو نثرها على شكل أكوام متفرقة على سطح الوسط مع مراعاة أن تتم الزراعة بجانب اللهب، ويمكن عمل عدة مكررات للعينة نفسها.

2- الطريقة الرطبة غير المباشرة:

نأخذ 1غ من التربة ونقوم بعمل معلق التربة بإضافة 10 مل من الماء المقطر المعقم أو الماء الفيزيولوجي المعقم أو نأخذ 10غ من التربة ونضيف عليها 100 مل من الماء السابق مع السحق فنحصل على معلق التربة الذي نقوم بتخفيفه ثم زراعته بأحجام محددة على أوساط الاستنبات الخاصة.

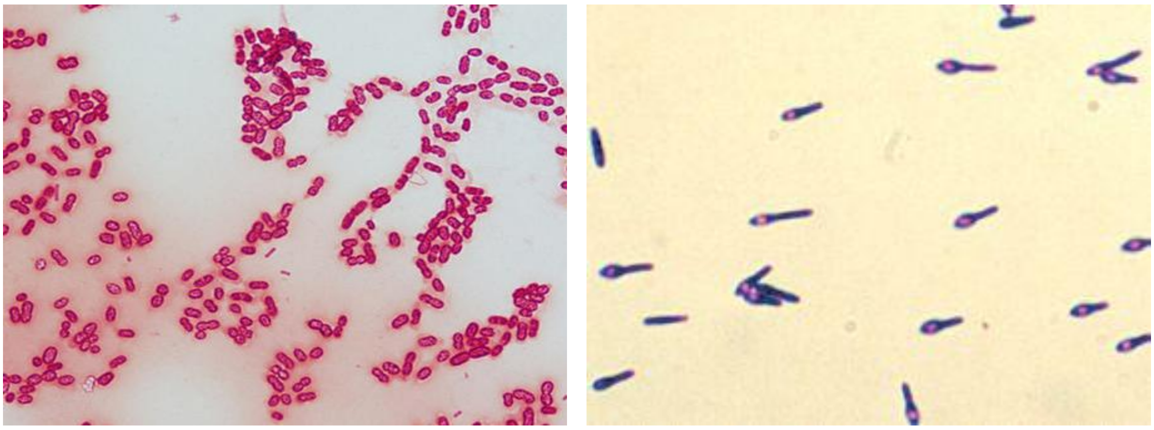
يمكن استخدام الطريقتين لتعداد الفطريات والجراثيم.

- **دراسة الجراثيم المثبتة للآزوت الجوي:**

تتأكسد الأملاح النشادرية في التربة متحولة لأملاح الآزوت ويسمى هذا التحول بالتأزت وتقوم به عدة أجناس من الجراثيم.

1- جراثيم التثبيت اللاتعايشي Non symbiotic Nitrogen fixing:

جراثيم التعايش التآلفي Associative symbiotic، وتعد المطثيات *Clostridium* من الجراثيم اللاهوائية التي تنمو في بيئة معدنية خالية من أملاح الآزوت، والآزوتوباكتر *Azotobacter* من الجراثيم المهمة التي تقوم بتثبيت الآزوت الجوي هوائياً والتي يسهل عزلها من التربة (الشكل 12-1)، ومن خواصها أنها هوائية إجبارية تنمو في بيئة خالية من الآزوت وتستمد الكربون من السكاكر المختلفة والنشاء والكحولات والأحماض العضوية، وتحتاج بعض العناصر المعدنية مثل الفوسفور والبوتاسيوم والكالسيوم، وخلاياها كبيرة الحجم نسبياً، عصوية أو بيضوية، محاطة بمحفظة وهي سالبة غرام.



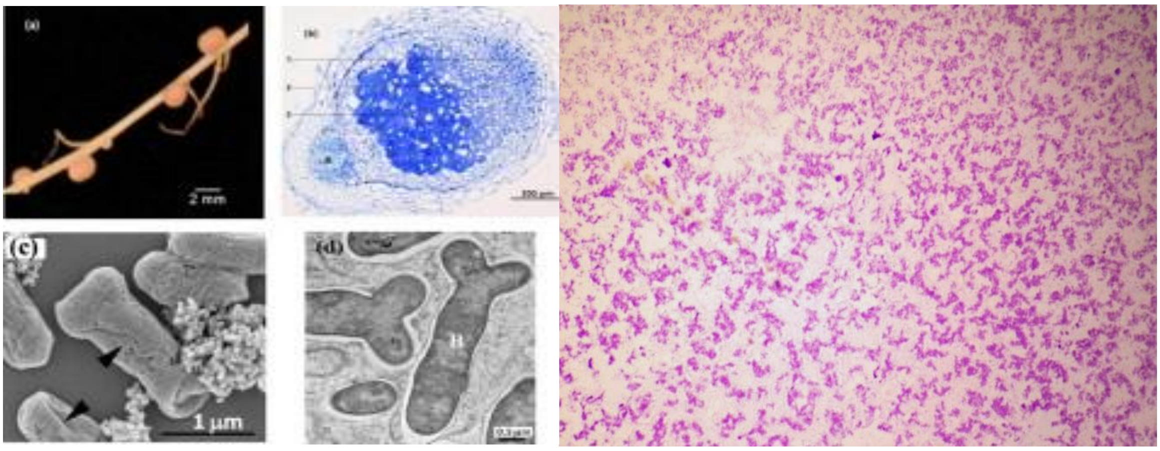
الشكل (12-1): جراثيم المطثيات *Clostridium* (يمين)، وجراثيم الآزوتوباكتر *Azotobacter* (يسار)

عزلها: يعتمد عزلها على تلقيح معلق التربة لأوساط غذائية سائلة أو صلبة خالية من الآزوت وهي أوساط تركيبية صنعية. تنمو على الأوساط السائلة على شكل غشاء رقيق وشفاف مائل للون الأصفر، أما على الأوساط الصلبة فتنمو على شكل مستعمرات بيضاء مخاطية لزجة.

2- جراثيم التثبيت التعايشي Symbiotic Nitrogen fixing Bacteria:

التعايش الإجباري Obligatory Symbiosis، ويعد الجنس *Rhizobium* مثالاً نموذجياً لهذه الجراثيم لأنه يمتلك القدرة على إصابة جذور النباتات البقولية والعيش داخل العقد الجذرية التي يشكلها بشكل يحقق تبادل منفعة بينه وبين النبات فهو يمنح النبات الآزوت الجوي المثبت ويأخذ بالمقابل المواد الغذائية اللازمة له. تتميز الجراثيم الموجودة داخل العقد حديثة السن بأنها عصوية الشكل، بينما تأخذ

الأشكال X، L، Y، T في العقد المسنة (الشكل 12-2)، ولذلك تسمى بأشباه الجراثيم Bacteroid، أما عند نموها على الأوساط المصنعة فإنها تصبح بشكل عصوي قصير، وهي غير متبوغة سالبة غرام.



الشكل (12-2): جراثيم *Rhizobium* وأشكالها في العقد المسنة Bacteroid

الأدوات والمواد اللازمة:

1- جذور نبات الفول أو أي نبات بقولي آخر. 2- محلول كلور الزئبق Cl_2Hg بتركيز 0.1% (1غ/ الليتر). 3- كحول 95%. 4- محاليل تلوين غرام. 5- صفائح زجاجية.

طريقة العمل:

1- تغسل جذور النبات جيداً بماء الصنبور لإزالة الأتربة.

2- تفصل العقد الكبيرة عن جذر النبات، وتغسل جيداً بماء الصنبور للتأكد من إزالة الأتربة.

3- توضع العقد في طبق بتري يحوي محلول كلور الزئبق 0.1 % لمدة 3- 6 دقائق.

4- تنقل العقد إلى طبق بتري آخر يحوي الكحول 95 % لمدة 3- 5 دقائق.

5- تنقل العقد إلى طبق بتري آخر يحوي ماء مقطر معقم لإزالة بقايا الكحول حيث تقلب العقد جيداً بداخله بوساطة ملقط معقم.

6- تنقل العقد إلى طبق بتري آخر يحوي ماء مقطر ومعقم.

7- نأخذ بالملقط المعقم أحد العقد ونهرسها بين صفيحتين زجاجيتين نظيفتين ومعقمتين (في حال أردنا أن نعزل أرومات نقية) حتى يسيل منها سائل عكر.

8- نعمل من السائل غشاء جرثومي ونلونه بطريقة غرام.

9- نفحصه تحت المجهر بالعدسة الغاطسة لملاحظة أشكال الجراثيم المختلفة في طور البكتريوئيد Bacteroid بشكل عصوي رفيع سالب غرام.

- جراثيم النشدرة والنترجة:

تفرز بعض الجراثيم من جنس *Clostridium* أو أنواع من *Actinomyces* أنزيمات بروتيناز خارجية تعمل على تفكيك البروتينات وتحويلها إلى ببتيدات تتحلل بدورها بأنزيمات الببتيداز التي تفرزها جراثيم أخرى مثل *B. pyocyanic* إلى حموض أمينية تتحلل بدورها إلى نشادر ومواد أخرى بوساطة بعض الجراثيم من نوع المتقلبات *Proteus* أو*Micrococcus*، وتستطيع بعض الجراثيم من جنس *Nitrosomonas* أن تؤكسد النشادر الناتج محولة إياه إلى نتريت، ثم تؤكسد جراثيم *Nitrobacter* النتريت محولة إياه إلى نترات، ويتم الكشف عن هذه الجراثيم بتلقيح وسط مناسب مثل مرق الببتون والفوسفات بعينات من تربة خصبة.

ثانياً- الأحياء الدقيقة في الأغذية:

تُعتبر الجراثيم والفطريات والخمائر عموماً من الميكروبات الملوثة للأغذية حيث توجد الفطريات والخمائر بصفة خاصة في الأطعمة الحمضية تنمو فيها وتسبب فسادها.

- الأدوات والمواد اللازمة:

1- وسط الآغار المغذي، وسط مستخلص الخميرة والغلوكوز، وسط مستخلص الشعير والآغار.

2- عينات من الطحين، بطاطا، لحم مفروم، جبنة، تفاح.

3- أطباق بتري معقمة

4- محلول 1 % غليسرول أو لاكتوفينول.

- طريقة العمل:

1- يصب الأوساط الغذائية في الأطباق.

2- يؤخذ خزعة أو مسحة من العينات السابقة وتلقح الأطباق المحتوية على الوسط بطريقة التخطيط ثم تترك بدرجة حرارة المختبر لمدة أسبوع.

3- لاحظ نمو الجراثيم والخمائر في الأطباق ثم اعمل غشاء جرثومي واصبغه بصبغة غرام، وكذلك لاحظ نمو الفطريات ثم خذ بالإبرة المعقمة جزء من المشيجة الفطرية وضعها في محلول الغليسرول على شريحة زجاجية وافحصها تحت المجهر وارسم ما تراه.

ثالثاً- الأحياء الدقيقة في الألبان:

- **فحص وعزل جراثيم حمض اللاكتيك من اللبن:**

تقوم جراثيم حمض اللاكتيك بتخمير اللاكتوز مكونة خثرة حمضية أهمها:
Str. Thermophilus، *Str. Lactis*، *L. bulgaricus*، *L. acidophilus*، *Leuconostoc citrovorum* والأخيرة مسؤولة عن الطعم والنكهة، ويوجد بعض الخمائر ككائنات ملوثة للألبان.

- طريقة العمل:

1- اعمل غشاء من عينة اللبن ثم جففها فوق مصباح كهربائي، وضع الشريحة في وعاء فيه زيلول لمدة دقيقة واحدة لإزالة الدهون ثم في وعاء فيه كحول إيتانول 95 % لتثبيت الغشاء ثم اغسله بالماء واصبغه بطريقة غرام.

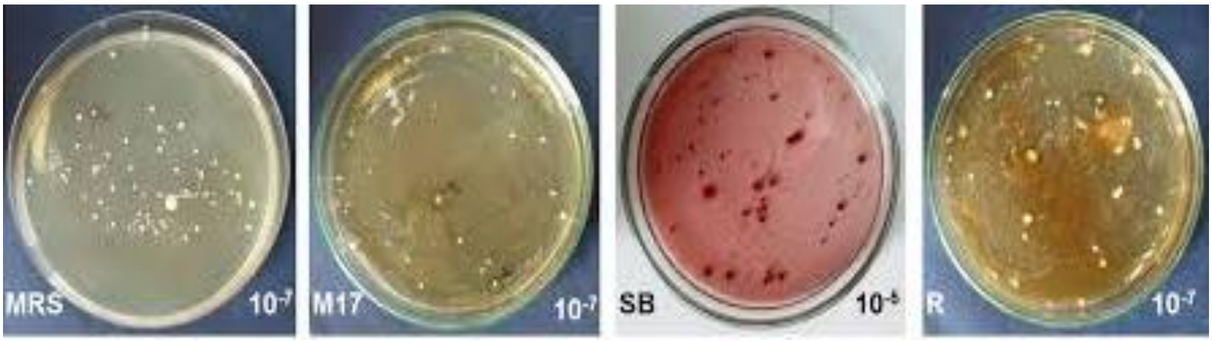
2- افحص الغشاء بالعدسة الزيتية وارسم ما تشاهده.

3- يُستعمل وسط Tween agar ووسط آغار الغلوكوز لعزل الجراثيم لأنها معقدة التغذية.

4- اعزل جراثيم حمض اللاكتيك من عينة اللبن بطريقة الأطباق المصبوبة.

5- احضن الأطباق بدرجة حرارة 30°م لمدة أربعة أيام.

6- شاهد وأوصف الجراثيم التي تظهر بأشكال نجمية أو عدسية أو مستديرة، واعمل منها غشاء واصبغه بطريقة غرام وارسم الجراثيم (الشكل 12-3).



الشكل (12-3): جراثيم *Lactobacillus* spp بتخفيف متعدد من اللبن

- **فحص الحليب:**

يعد الحليب بيئة غذائية ملائمة لنمو الاحياء المجهرية عند توفر درجات الحرارة الملائمة فهو غني بالبروتينات والكاربوهيدرات والدهون والمعادن والفيتامينات المهمة بالإضافة إلى الحموضة الملائمة (6.7) ورطوبته الملائمة للنشاط الميكروبي لذلك فهو عرضة للتلف بالجراثيم الأعفان والخمائر، ومن جهة اخرى قد يصبح الحليب وسطاً ناقلاً لكثير من الأمراض للإنسان مثل الحمى المالطيةMalta fever والتسمم الغذائي بالسموم المعوية لجراثيم *Streptococcus pyogens* في حال لم يبستر بالصورة الصحيحة. من الاجناس الشائعة في الحليب *Lactobacillus*، *Streptococcus*، *Micrococcus*، *Coli forms*، كما توجد انواع ممرضة مختلفة باختلاف مصدر التلوث تشمل:

1- الحيوان: *Brucella*، *Staph. Aureus*، *Mycobacterium bovis*.

2- الإنسان: *Shegella*، *Salmonella*.

3- البيئة: *Bacillus*، *Clostridium*.

يحوي الحليب الذي حلب للتو ما بين (102-103) جراثيم/مل، والعدد الجرثومي اللازم لإحداث تغيرات غير مرغوبة من لون وطعم يتطلب (107) خلية/مل. يجري تقييم الحليب لمعرفة جودته وسعره وصلاحيته للاستعمال في مصانع الألبان حسب اختبارين أساسيين يتم الأول بحساب نسبة الدسم التي تختلف حسب نوع الحيوان ووقت الحلابة وغش الحليب بالماء، والاختبار الثاني يتم بتعداد الجراثيم التي تختلف حسب الزمن الذي مضى منذ الحلابة وطريقة التخزين ونظافة الحليب وتداوله.

- تعداد الجراثيم في الحليب بطريقة الأطباق:

الأدوات اللازمة:

1- نماذج من الحليب الخام، والمغلي، والمبستر.

2- ماصات دقيقة، وأطباق بتري، وأنابيب اختبار.

3- وسط غذائي يحوي على تربتوفان غلوكوز آغار الحليب منزوع الدسم.

- طريقة العمل:

1- تجرى تخفيفات عشرية متسلسلة على عينة الحليب حتى 10^{-6}

2- يؤخذ 1 مل من التخفيفات من 10^{-2} وحتى 10^{-6} وتوضع في أطباق معقمة.

3- يصب الوسط الغذائي السائل بحرارة 50°م في الأطباق وتحرك وتترك حتى تتجمد.

4- تحضن الأطباق بحرارة مناسبة 37°م لمدة 48 ساعة، ثم يجرى تعداد للمستعمرات في التخفيف المناسب، ويضرب العدد بمقلوب التخفيف والمتوسط الحاصل هو عدد الجراثيم في 1 مل من الحليب.

تكرر التجربة على عينات الحليب المختلفة وتقارن النتائج.

- تعداد الجراثيم في الحليب بإرجاع أزرق الميتيلين:

يستخدم هذا الاختبار لمعرفة الفعالية الحيوية للجراثيم في الحليب حيث يتناسب النشاط طردياً مع العدد وحسب معدل تنفسها تتهيأ الظروف اللاهوائية فتختزل الصبغات. يجري تقدير عدد الخلايا الجرثومية الحية في وسط ما حسب الزمن اللازم لإرجاع صبغة أزرق الميتيلين المخففة والمضافة للوسط لأنّ هذه الصبغة تصبح عديمة اللون في الوسط المرجع، والجراثيم الحية تحدث فعلاً ارجاعياً في الوسط مهما اختلفت احتياجاتها الهوائية، وعلى هذا الأساس صممت هذه التجربة التي تستخدم على نطاق واسع في مصانع الألبان لسهولة إجراؤها ولأنها تحسب كل أنواع الجراثيم الحية.

طريقة العمل:

1- يوضع في أنبوب اختبار 1 مل من صبغة أزرق الميتيلين (20000/1)

2- يوضع في الأنبوب 10 مل من الحليب ويخلط جيداً بهدوء بدون تشكيل فقاعات ويغلق.

3- يوضع الأنبوب في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م، ويراقب زمن زوال اللون كل نصف ساعة.

4- تكرر هذه الطريقة على كل نماذج الحليب.

الجدول (12-1): عدد الجراثيم ونوعية الحليب حسب زمن زوال اللون

الزمن اللازم لزوال اللون	عدد الجراثيم في 1مل من العينة	نوعية الحليب
أكثر من 10 ساعات	أقل من 50 ألف	جيد جداً
من 5- 10 ساعات	من 50 ألف حتى 0.5 مليون	جيد
من 2- 5 ساعة	من 0.5- 4 مليون	وسط مقبول
من 20 دقيقة إلى ساعتين	من 4- 20 مليون	سيء
أقل من 20 دقيقة	أكثر من 20 مليون	سيء جداً

الجدول (12-2): الأوساط الغذائية المستخدمة في فحص الأغذية للكشف عن الميكروبات الممرضة

الميكروب	بيئة الإكثار	بيئة الصب في الأطباق
Cl. Botulinum	بيئة اللحم المطبوخ مع الغلوكوز والنشاء	بيئة آغار الدم ومستخلص اللحم
Cl, perfringens	بيئة الثيوغليكولات أو بيئة اللحم المطبوخ	بيئة آغار الكبريتيت والبوليمكسين والسلفاديازين
Staph. aureus	بيئة اللحم المطبوخ مع 10% ملح طعام أو بيئة المانيتول والسوربيك	بيئة آغار الجراثيم العنقودية
Fecal streptococci	بيئة مرق الدكستروز والأزيد بيئة مرق KF	بيئة آغار KF بيئة آغار الدم وأزيد الصوديوم
Salmonella	بيئة مرق اللاكتوز بيئة مرق السيلينيت والسيستين	بيئة آغار السالمونيلا والشغيلا
Shigella	بيئة مرق اللاكتوز بيئة مرق السيلينيت والسيستين	بيئة آغار السالمونيلا والشغيلا

انتهت المحاضرة