الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة حماة

كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية الخامسة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

عزل الجراثيم وحفظ المزارع الجرثومية

يمكن عزل الجراثيم من بيئتها الطبيعية (ماء- هواء- تربة- أغذية- عينات مرضية ... الخ). تختلف طرائق العزل حسب البيئة فلكل بيئة خاصية معينة، وبشكل عام يتم عزل الأنواع الجرثومية بدءاً من المستعمرات المنفصلة النامية فوق وسط من الآغار المغذي والمستنبتة بطريقة الخطوط أو بطريقة التخفيف، ويكون ذلك بنقل جزء من هذه المزارع بإبرة الزرع على وسط مغذ مناسب ثم حضنه بدرجة حرارة مناسبة لزمن مناسب كي نحصل على نمو جيد. يمكن اختبار عملية العزل بإعادة الزرع على وسط مغذي مناسب في أطباق بتري بطريقة الخطوط أكثر من مرة حتى نحصل على نمط واحد من المستعمرات الجرثومية.

يتم حفظ الجراثيم الهوائية باستنباتها بطريقة الآغار المائل، أما الجراثيم اللاهوائية فتتطلب طريقة مختلفة حيث تستخدم طريقة الآغار المطعون (الوخز) Agar-Stab، وبعد التلقيح تضاف طبقة من الزيت المعدني فوق الوسط المغذي لمنع التبخر ومنع وصول الأوكسجين إلى المزارع الجرثومية.

إنّ استنبات وحفظ الجراثيم اللاهوائية الإجبارية يتطلب استخدام أوساط تتمتع بخصائص إرجاعية قوية مثل وسط تيوغليكولات السائل Thioglycolate broth الذي يحوي على الغلوكوز Glucose والسيستين Cystine، والصبغة Resazurine التي توضح وجود الأوكسجين من عدم وجوده حيث تميل إلى اللون الزهري في وجود الأوكسجين لذلك يكون اللون في أعلى الأنبوب زهرياً أما أسفل الأنبوب فيكون عديم اللون.

ينبغي تجديد الجراثيم المعزولة والمحفوظة بين مدة وأخرى لأن بقاءها مدة طويلة جداً في الثلاجة يمكن أن يؤدي إلى حدوث الطفرات. لنتجنب ضرورة تجديد الوسط والنقل المتكرر للمزارع النقية نعمد إلى حفظها في شروط تسمح ببقائها حية دون نمو أو تكاثر ودون أن تعاني من تغيرات وراثية، وتعدُّ طرق التبريد والتجفيف أفضل الطرق لحفظ المزارع الجرثومية في حالة سبات.

طرائق حفظ المزارع الجرثومية:

أولاً: الحفظ لمدة قصيرة الأجل: 1- الزراعة المتكررة:

هي طريقة تقليدية لحفظ المزارع الجرثومية حيث تتم عملية الزراعة المتكررة في بيئات حديثة التحضير ضمن أنابيب من الآغار المغذي المائل، وتختلف المدة الزمنية للحفظ حسب النوع الجرثومي ونوع البيئة والظروف الخارجية. تصلح هذه الطريقة عادة لحفظ الجراثيم عدة أسابيع (حوالي الشهرين).

2- الحفظ تحت طبقة من الزيت المعدني:

تستطيع العديد من الأنواع الجرثومية أن تبقى حية لشهور وسنين تحت طبقة من الزيت المعدني المعقم حيث يتم تنمية الجراثيم في البيئة المناسبة في صورة سائلة، وعند درجة حرارة مناسبة حتى نحصل على نمو جيد، ثم يضاف الزيت المعدني المعقم تحت ظروف التعقيم بحيث يغطي النمو (يضاف بنسبة 15- 20% من حجم البيئة)، وتحفظ المزارع في الثلاجة عند درجة حرارة صفر إلى 20°م، ويمكن نقل المزرعة الجرثومية من تحت الزيت المعدني إلى بيئة حديثة التحضير مع أخذ الحذر إذ إن الزيت المعدني قابل للاشتعال.

3- التجفيف:

تموت معظم الأنواع الجرثومية إذا تركت تجف في المختبر إلا أن الأنواع التي تستطيع إنتاج الأبواغ Spores يمكن أن تحفظ بالتجفيف في الوسط المناسب (التربة أو أقراص الترشيح أو الجيلاتين).

ثانياً: الحفظ لمدة طويلة الأجل:

1- التجفيف مع التجميد (التجفيد) Freeze-drying (Lyophillzation):

تُعدّ هذه الطريقة من أفضل الطرائق لحفظ الجراثيم والكائنات الحية الدقيقة الأخرى حيث تظل هذه الكائنات في صورة حية لمدة تصل إلى ثلاثين عاماً. تعتمد فكرة هذه الطريقة على إزالة الماء من داخل المعلق الجرثومي، وعند الحاجة إليها يمكن بسهولة إعادة تعليقها في الماء مرة أخرى.

2- التجميد العالي والحفظ تحت النتروجين السائل:

يتم التجميد السريع والحفظ في حالة مجمدة عند درجة حرارة النتروجين السائل (- 196°م)، وتصلح هذه الطريقة لحفظ المزارع الجرثومية لمدة عشرين عاماً.

تقنية تحضير الجراثيم للفحص المجهري ودراستها

Techniques of Bacteria preparing for Microscopic test

يمكن إجراء الفحص الشكلي للخلايا الجرثومية بطريقتين:

1- فحص الخلايا الحية دون صبغها كما يحدث في فحص حركة الجراثيم.

2- فحص الخلايا المثبتة (الميتة) المصبوغة بالصبغات المتنوعة.

إنّ الجراثيم كائنات حية دقيقة صغيرة الحجم خلاياها شفافة لذلك لابد من صبغها قبل فحصها بالمجهر، وذلك بعد تحضير العينات وتثبيتها بدقة وعناية.

- **استعمال المجهر لفحص المحضرات الجرثومية:**

من أجل رؤية الجراثيم لابد من تكبيرها من 600 - 1200 مرة، ولفحص المحضر المهيأ والملون بالمجهر نستعمل العدسة الغاطسة التي تتميز عن غيرها من العدسات بوجود إطار أسود في نهايتها السفلية، وعند الفحص نضع على اللطخة الملونة قطرة من زيت الأرز عوضاً عن استعمال الساترة.

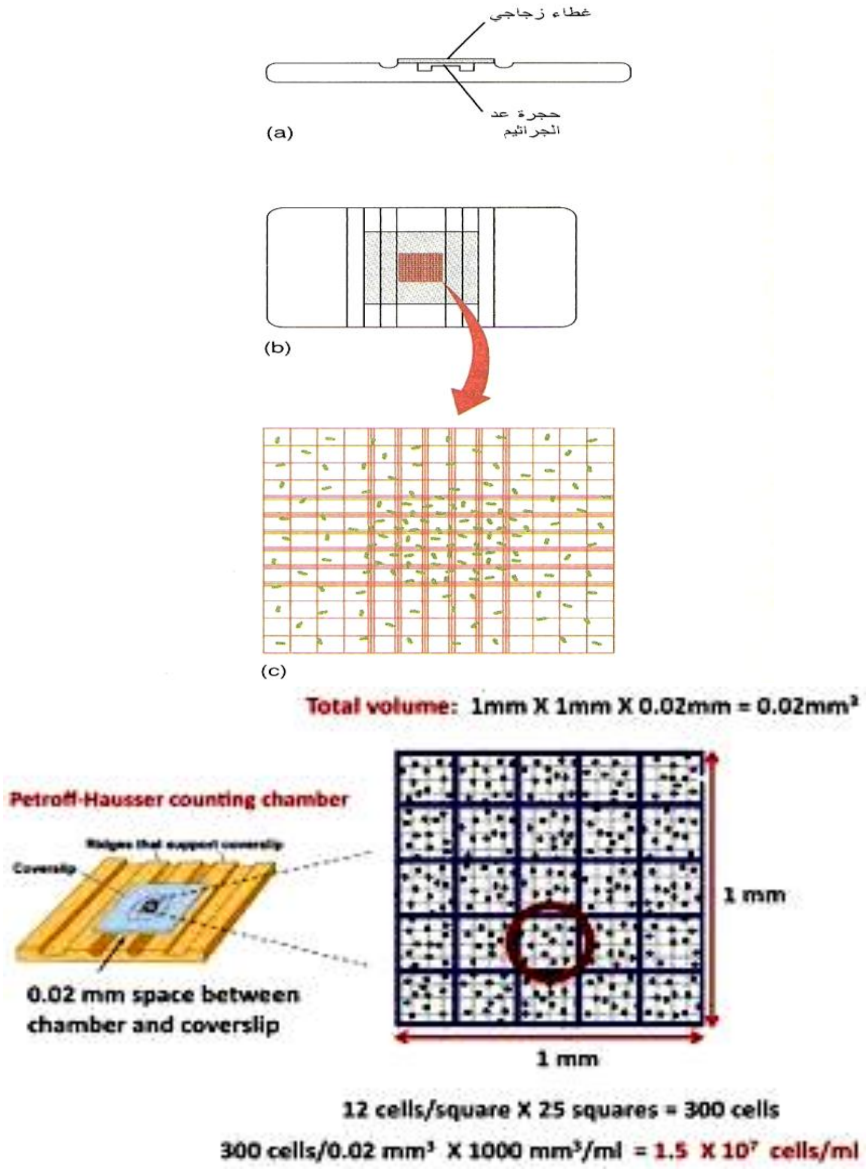
عند استعمال المجهر نستعمل عادة الإنارة الذاتية، ونرفع المكثف إلى الأعلى مع فتح الحظار كاملاً. نضع الصفيحة على الرف ونثبتها بالقابضين، ونفحص بالتكبير 40 أو60 أولاً حتى وضوح الرؤية ثم ندير على العدسة الغاطسة، ونضبط الرؤية بلولب الإحكام البطيء، أو نترك العدسة الغاطسة حتى تلامس قطرة الزيت، وبعد ذلك ننظر من العدسة العينية، ونحرك اللولب لرفع العدسة الغاطسة من الأسفل إلى الأعلى حتى ظهور معالم المحضر، وبعد ذلك نجري المطابقة باللولب الصغير (البطيء)، وبعد إنهاء الفحص لابد من مسح قطرة زيت الأرز عن سطح العدسة الغاطسة، ويتم ذلك بوساطة قطعة من القطن مبللة بالزيلول (غول الخشب)، وإذا أردنا حفظ المحضر نمسحه بلطف بقطعة من القطن المبللة بالزيلول، ونتركه ليجف، ثم يحفظ لمدة طويلة (يمكن أن نسحب الماء من الخلايا بالكحول المطلق ثم نزيل أثر الكحول بالزيلول، ونضع حول الساترة بلسم كندا، وبذلك يكون قد حفظ بشكل دائم). أما الفحص المجهري للجراثيم، فيتم إما مباشرة بالحالة الحية أو بعد إجراء عملية التثبيت والتلوين لها.

أولاً- الفحص المباشر:

يجرى هذا الفحص على الجراثيم الحية غير المصبوغة، والهدف منه التحري عن وجود الجراثيم وتقدير عددها الأولي في العينة المدروسة، وذلك باستعمال صفائح خاصة مثل صفيحة بتروف هوسر Petroff – Hausser، ودراسة شكلها الخارجي وحجمها وطريقة تجمعها إن أمكن، والأهم من ذلك هو دراسة حركتها.

- **صفيحة بتروف هوسر Petroff – Hausser:**

هي صفيحة فيها حجرة للعد تساعد على إجراء إحصاء لعدد الجراثيم في عينة ما بشكل دقيق وسريع ودون تلوين، وتستخدم على التكبير × 400 أو × 500. حجرة العد مقسمة إلى 25 مربعاً تغطي مساحة 1 ملم^2 ولها عمق مقداره 0.025 ملم أي أن حجمها معلوم ويساوي 0.025 ملم^3. نختار أفضل تركيز للجراثيم في مربع واحد ونحصيها، ثم نضرب العدد بالرقم 25 فنحصل على وسطي عدد الجراثيم في حجم حجرة العد، ومنه يمكن حساب عدد الجراثيم في المليلتر الواحد من العينة بضرب الرقم الناتج بالعدد 50 × 1000 (الشكل 13).

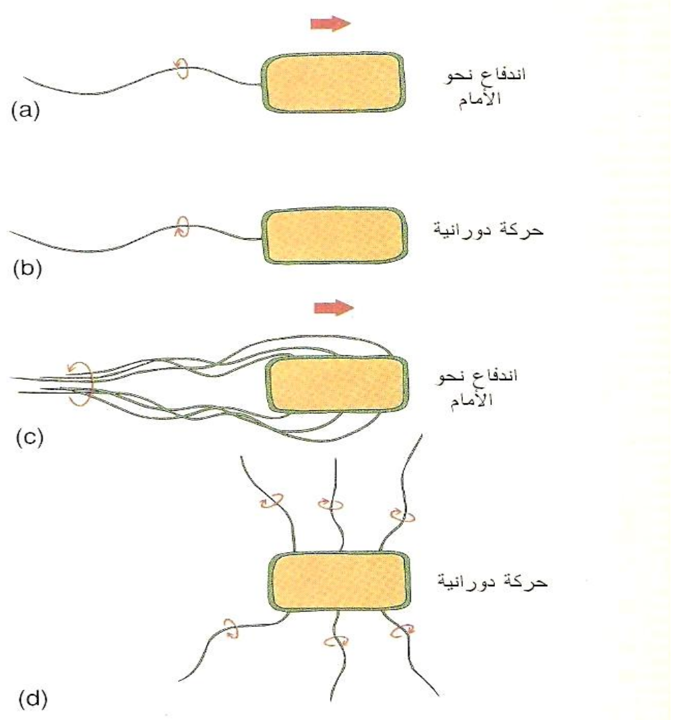


الشكل 13– حجرة بتروف هوسر لتعداد الميكروبات

(a) منظر جانبي للحجرة – (b) منظر علوي للحجرة – (c) تكبير شبكة المربعات.

- **دراسة الحركة عند الجراثيم:**

يجب التفريق بين الحركة الحقيقية الناتجة عن وجود السياط حيث تندفع الجراثيم كالسهم بحركة مستقيمة أو بحركة دورانية انقلابية، وهذا يعود لتوزع السياط في الخلية الجرثومية (الشكل 14)، وبين الحركة الكاذبة الناتجة إما عن جذب السائل إذ تنجذب جميع الجراثيم بالاتجاه نفسه بسبب حركة السائل، أو عن الحركة البراونية الناتجة عن اصطدام الجراثيم بجزيئات السائل الموجودة فيه مما يجعلها تهتز بسرعة دون أن تنتقل من مكانها.



الشكل 14- نمط الحركة عند الجراثيم

يجرى هذا الفحص بالقطرة المعلقة Hanging drop.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- صفائح زجاجية مجوفة (صفائح ذات الحفرة).

2- ساترات زجاجية.

3- فازلين.

4- مزارع جرثومية سائلة عمرها 18- 24 ساعة.

طريقة العمل: (الشكل 15)

1- نظف الصفيحة الزجاجية جيداً، ونظف الساترة.

2- ضع بوساطة قضيب زجاجي قليلاً من الفازلين حول تجويف الصفيحة، أو على أطراف الساترة.

3- ضع قطرة صغيرة من المزرعة الجرثومية في منتصف الساترة الزجاجية بإبرة التلقيح.

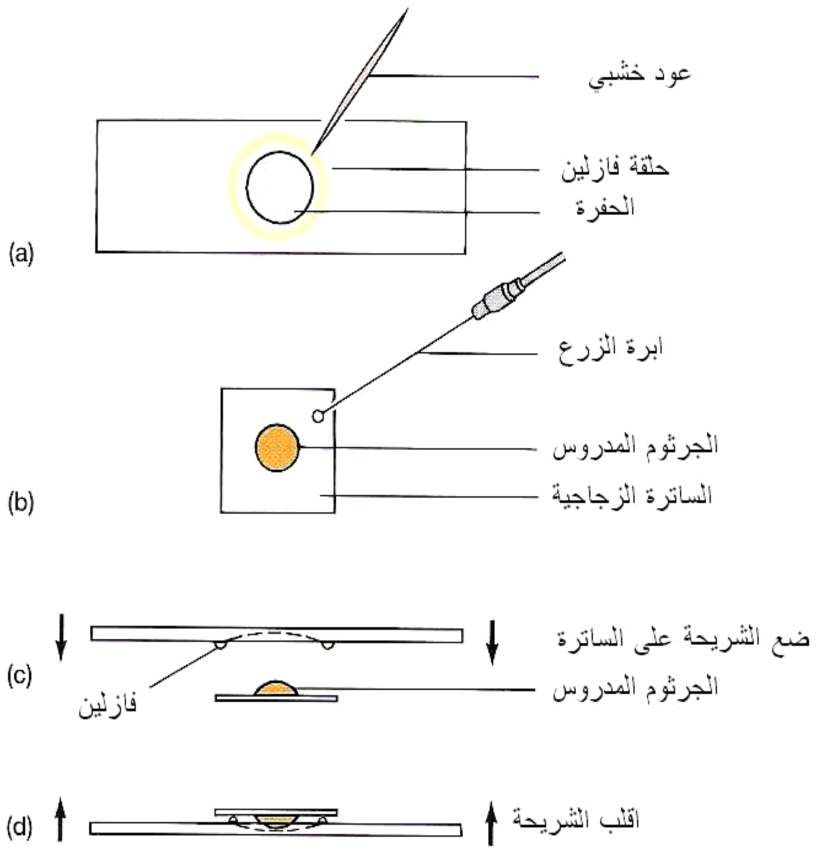
4- ضع الصفيحة على الساترة بحيث تكون قطرة المزرعة في وسط حفرة الصفيحة فتلتصق الساترة بالصفيحة بسبب وجود الفازلين (وظيفة الفازلين لصق الصفيحة بالساترة من جهة ومنع جفاف المحضر من جهة أخرى).

5- اقلب الصفيحة باحتراس، ولاحظ بقاء القطرة معلقة على الساترة.

6- افحص تحت المجهر بالتكبير الضعيف أولاً ثم بالتكبير القوي.

7- دوّن ملاحظاتك.

إذا كان المحضر نظيفاً والمجهر كذلك فإنك سوف تستطيع التفريق بين الجراثيم المتحركة وغير المتحركة وتمييز طريقة الحركة.



الشكل 15- آلية إجراء القطرة المعلقة

- **فحص الجراثيم بعد التثبيت والتلوين:**

الهدف من فحص الجراثيم بعد تلوينها هو تسهيل رؤيتها ودراسة شكلها وحجمها واصطفافها ودراسة صفاتها الخلوية الخارجية التي لا يمكن تمييزها بالفحص العادي (كرؤية السياط أو المحفظة)، كما يمكن بالتلوين معرفة الخواص التلوينية للخلية الجرثومية التي تفيد في معرفة هوية الجرثوم (مثال ذلك طريقة غرام التي تميز بين نمطين من الجراثيم، ودراسة مقاومة الجراثيم للكحول والحمض .... الخ).

قبل أن نستعرض طرق التلوين يجب أن نأخذ فكرة بسيطة عن الملونات وطبيعتها.

- طبيعة الملونات:

الملونات هي مواد صباغية تلون الجراثيم، ويكون هذا التلوين إما بالتصاق المادة الملونة وترسبها على الجرثوم (على سطح الخلية الجرثومية)، ومن أمثلة الترسيب عملية التفضيض بأملاح الفضة، أو الامتزاز على سطح الخلية (التلوين السلبي Negative staining)، أو بدخول الملونات عبر الغلاف الخلوي للجرثوم وتكوين معقدات مع مركباته الكيميائية، إذاً التلوين يكون إما بطريقة فيزيائية (امتزاز وترسيب)، أو بطريقة كيميائية (اتحادات كيميائية وتشكيل معقدات)، والملونات منها ما هو طبيعي كالهيماتوكسيلين Hematoxyline والحبر الصيني، ومنها ما هو صنعي. إن الملونات التي يكمن اللون فيها في الجزء إيجابي الشحنة تدعى بالملونات القلوية من أمثلتها الفوكسين– الزعفران – بنفسجي الجانسيان (البلورات البنفسجية)، أما الملونات التي يكون الجزء الملون فيها هو المشحون سلبياً أي الشاردة السالبة هي حاملة اللون فتسمى بالملونات الحامضية مثالها الأيوزين المستخدم بشكل أيوزينات الصوديوم وحمض المر، وهناك ملونات معتدلة مثل أيوزينات زرقة الميتلين– أيوزينات الآزور. بصورة عامة تنتخب النواة الملونات الأساسية، وتنتخب الهيولى الملونات الحامضية (الشكل 16).

الشكل (16): الملون الحمضي الأيوزين (يمين)، والملون القلوي بنفسجي الجانسيان (يسار)

– **تحضير النموذج للتلوين:** هو تحضير الغشاء الجرثومي إما ابتداءً من مستعمرة نامية على وسط صلب، أو من بيئة سائلة.

– **تحضير الغشاء الجرثومي وتثبيته ابتداءً من مستعمرة صلبة:**

إن الفحص المجهري للجراثيم الملونة يقتضي قتلها أولاً، وتثبيت الخلايا على الصفيحة الزجاجية ثانياً حتى لا تنجرف الخلايا أثناء عملية التلوين، ولتحقيق ذلك اعتمد الطريقة البسيطة الآتية:

1– نظف الصفيحة الزجاجية جيداً بمزيج من الكحول وحمض كلور الماء HCl بنسبة 9 : 1.

2– خذ كمية قليلة من المستعمرة الجرثومية الفتية بإبرة البلاتين المعقمة والمبردة، وضعها في منتصف الصفيحة الزجاجية ضمن قطرة ماء معقم صغيرة الحجم.

3– افرش اللطخة الجرثومية بدلكها بإبرة البلاتين بحركة دورانية حتى تشكل غشاءً رقيقاً متجانساً نسميه اللطخة الجرثومية Smear.

4– جفف اللطخة في تيار من الهواء ثم ثبتها بتمريرها ثلاث مرات متتالية فوق اللهب حوالي 20 سم.

إن التسخين الخفيف يقتل الخلايا، ويجعلها تلتصق بسطح الصفيحة لكن التسخين الزائد يمكن أن يؤدي إلى تخريب بنية الخلية الجرثومية، ويمكن التأكد من أن حرارة الصفيحة مناسبةٌ بجعلها تلامس ظهر اليد، إذ ينبغي أن تكون دافئة وغير حارقة. تسمى هذه العملية بعملية التثبيت Fixation.

يمكن إجراء عملية التثبيت هذه باستعمال الكحول بتركيز 96 % حيث تترك من 10– 20 ثانية، ثم تمرر الصفيحة على اللهب للتخلص من آثار الكحول المتبقية.

5– اغسل الغشاء البكتيري بعد تثبيته بالماء المقطر للتخلص من آثار بعض الأملاح والمفرزات الموجودة في الوسط أو المفرزة من الجرثوم بغية عدم إعاقة وصول الملون إلى الخلية الجرثومية.

ملاحظة: إذا كنا نريد تلوين المحفظة يجب عدم غسْلِ الغشاء الجرثومي بالماء كي لا تذوب المحفظة.

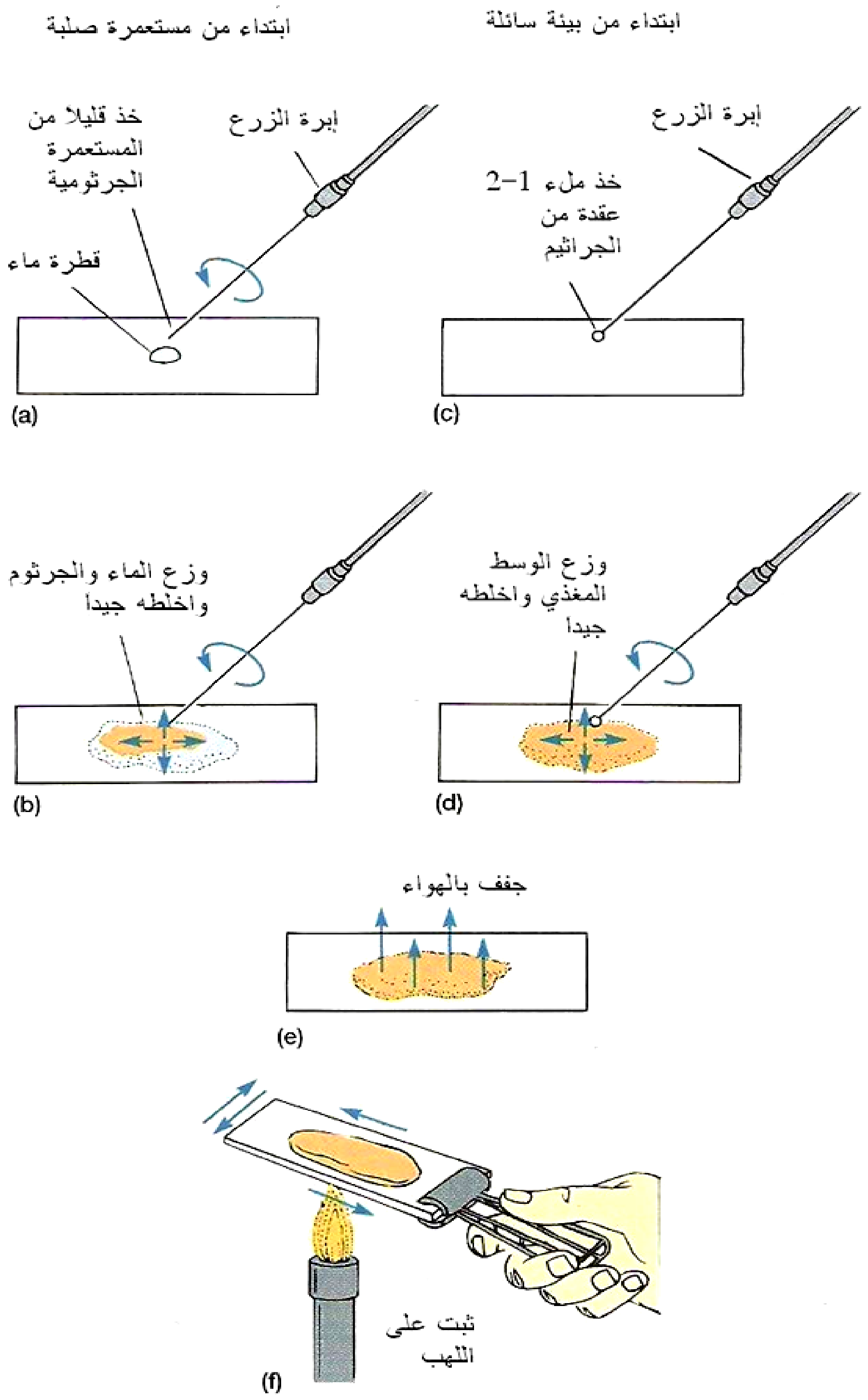
– **تحضير غشاء رقيق من بيئة سائلة:**

1– حرك البيئة السائلة بطريقة الهز.

2– عقم الإبرة، وبردها ثم ضع قطرة من المزرعة على سطح الصفيحة الزجاجية، وافرشها بحيث تشكل غشاءً جرثومياً رقيقاً، وفي حال كان المعلق كثيفاً خفف المزرعة قبل استعمالها.

3– اترك الغشاء يجف في درجة حرارة الغرفة.

4– ثبت الغشاء بتمرير الصفيحة الزجاجية على اللهب عدة مرات بحيث لاتصل درجة الحرارة الصفيحة إلى درجة يصعب معها لمس الصفيحة باليد (الشكل 17).



الشكل 17– آلية تحضير الغشاء الجرثومي

انتهت المحاضرة