## ♣ اجزاء المجهر الضوئي :

١. **القاعدة Base:** تستخدم لغرض حمل باقي أجزاء المجهر وغالباً ما تحوي على المصدر الضوئي.

٢. **الذراع Arm :** يحمل المسرح وكذلك جسم الأنبوب بالإضافة إلى المنظم الكبير والدقيق.

٣. **المصدر الضوئي Light source :** يتم من خلاله توليد الحزم الضوئية التي يتم توجيهها نحو العينة.

٤. **جسم الأنبوب Body tube :** يحتوي العدسات العاكسة projector lenses التي من خلالها يتم توجيه الحزم الضوئية نحو العدسات العينية.

٥. **القطعة الأنفية Nosepiece :** تحمل العدسات الشيئية وتقوم بتحريكها حسب قوة التكبير المطلوبة.

٦. **المنظم الكبير Coarse adjustment knob :** يستخدم للحصول على التوضيح الأولي للعينة.

٧. **المنظم الدقيق Fine adjustment knob :** يستخدم للحصول على التوضيح الدقيق والنهائي للعينة.

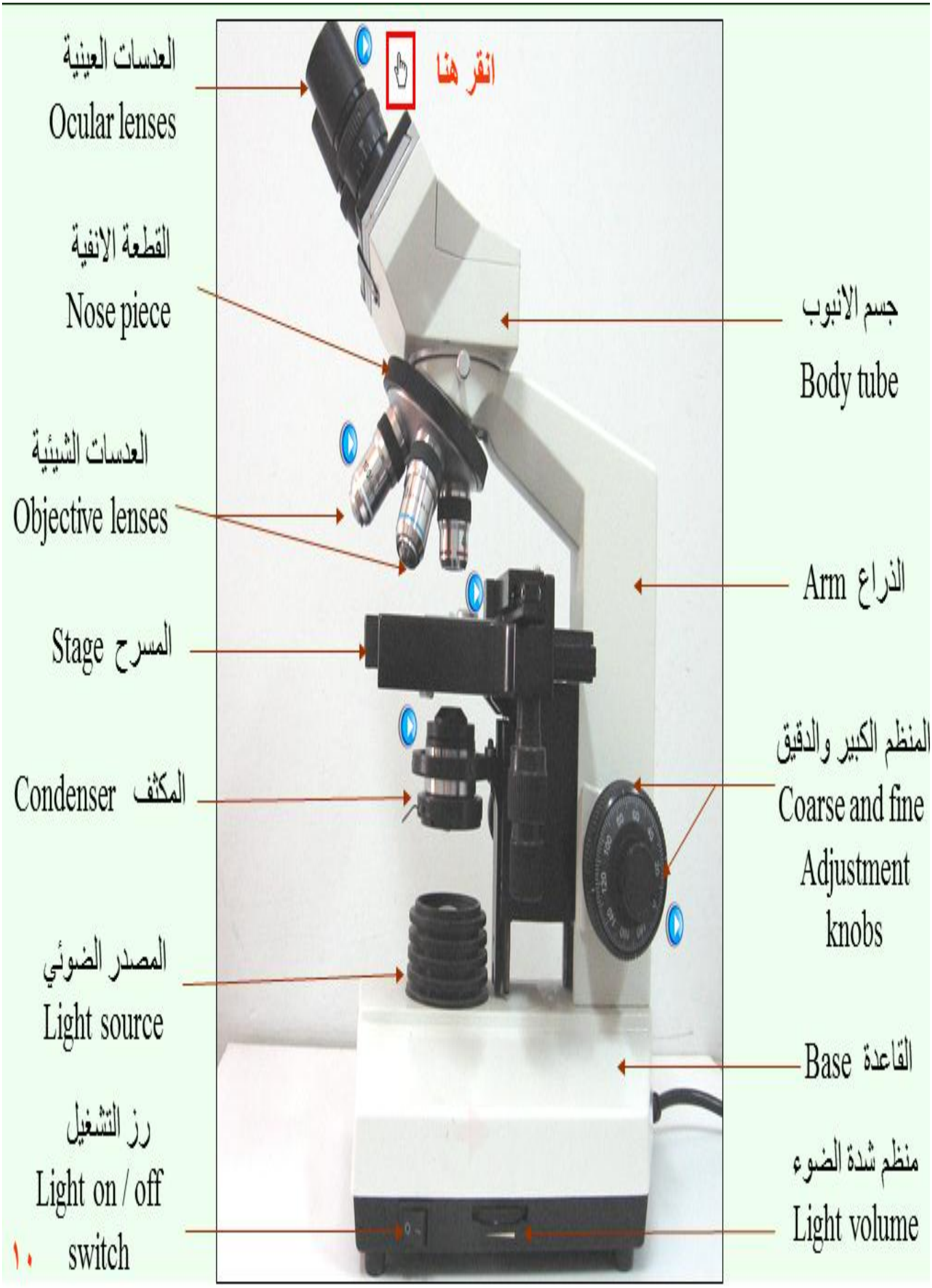
٨. **المسرح مع ماسك الشريحة Stage with slide clips :** يتم تثبيت الشريحة الزجاجية عليه كما يقوم بتوجيه العينة أثناء الفحص.

٩. **المكثف مع الحجاب القزحي Condenser with iris diaphragm :** يستخدم لتكثيف وتوجيه الحزم الضوئية نحو العينة كما يقوم الحجاب القزحي بالتحكم بكمية الضوء المارة من خلاله.

١٠. **منظم المكثف Condenser adjustment knob:** يقوم بالتحكم برفع وخفض المكثف والحجاب القزحي.

١١. **العدسات العينية Ocular lenses ( Eye Pieces ):** تقوم بالتكبير النهائي للصورة وتكون فيها قوة التكبير 10 x.

١٢. **العدسات الشيئية Objective lenses :** تقوم بالتكبير الأولي لصورة العينة وتختلف فيها قوة التكبير حسب العدسة المستخدمة ( 4 x, 10 x, 40 x, 100 x ).


العدسات العينية
Ocular lenses
انقر هنا
القطعة الانفية
Nose piece
جسم الانبوب
Body tube
العدسات الشيئية
Objective lenses
الذراع Arm
المسرح Stage
المنظم الكبير والدقيق
Coarse and fine
Adjustment
knobs
المكثف Condenser
المصدر الضوئي
Light source
القاعدة Base
رز التشغيل
Light on / off
switch
منظم شدة الضوء
Light volume

♣ **انواع المجاهر :**

| | |
|---|---|
| ١. المجهر المجسم | **Stereomicroscope** |
| ٢. مجهر الحقل المعتم | **Dark field microscope** |
| ٣. المجهر المتباين الأطوار | **Phase- contrast microscope** |
| ٤. المجهر المتألق | **Fluorescent microscope** |
| ٥. المجهر الالكتروني | **Electron microscope** |
| ٦. المجهر الالكتروني التفرسي | **Scanning electron microscope** |

## ١. التعقيم Sterilization

هي عملية إزالة أو قتل جميع الأحياء المجهرية من على سطح شيء معين أو مادة ما. ولا توجد درجات للتعقيم فإما أن تكون المادة معقمة sterile أو غير معقمة not sterile.

## ٢. التطهير Disinfection

هي قتل أو تحطيم الأحياء المجهرية المرضية الخضرية vegetative pathogens في أو على المواد بحيث لم تعد تشكل خطراً. يستعمل مصطلح المطهر disinfectant للإشارة إلى العوامل الكيمياوية المستخدمة في تطهير الأشياء الغير حية inanimate objects.

**تقسم طرق التعقيم الى قسمين رئيسين هما :**

### الطرق الفيزيائية Physical methods

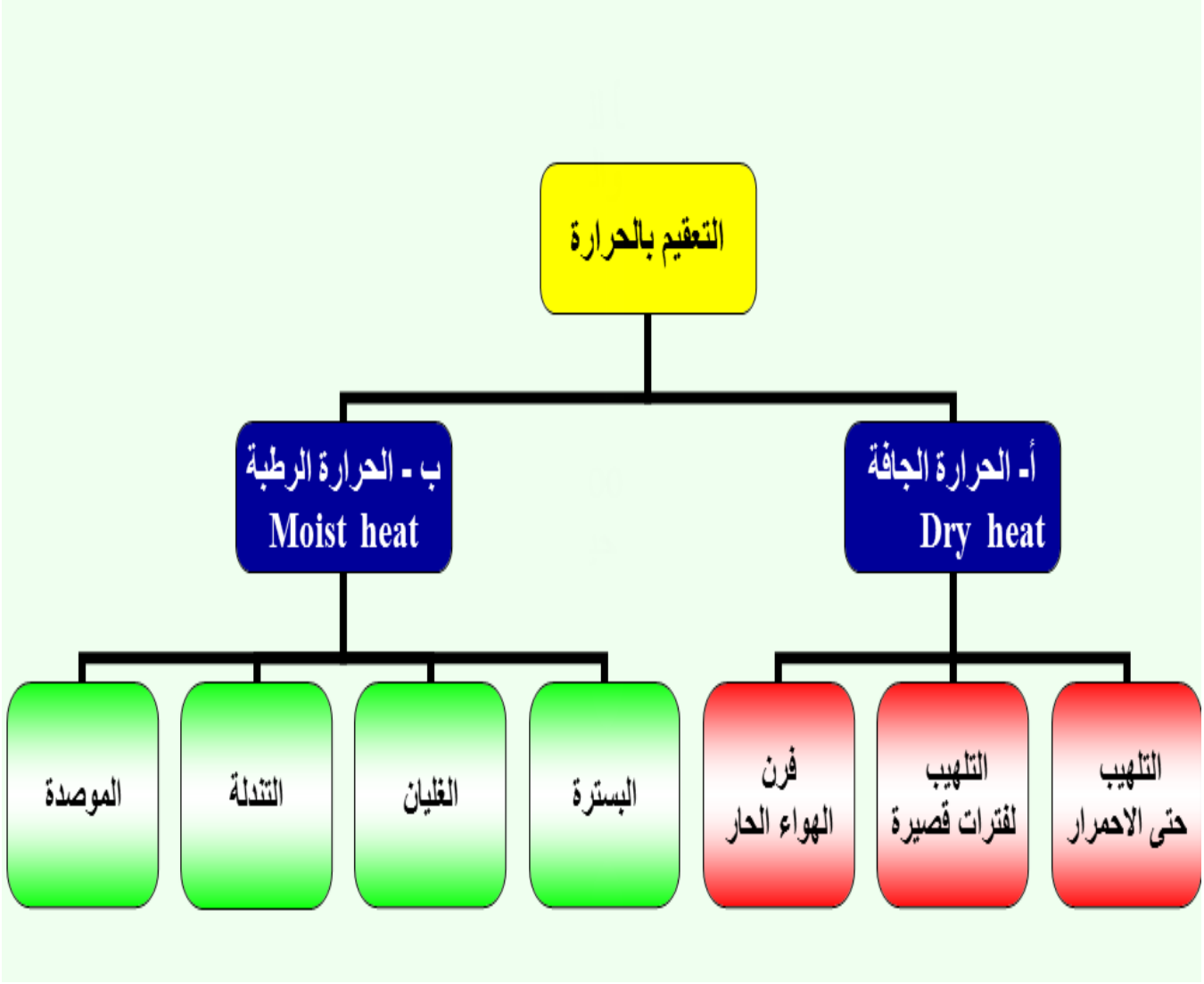
١. الحرارة Heat
٢. الترشيح Filtration
٣. الإشعاع Radiation

### الطرق الكيميائية Chemical methods

١. الفينول والفينولات Phenol and phenolic
٢. الكحولات Alcohols
٣. الهالوجينات Halogens
٤. المعادن الثقيلة Heavy metals
٥. العوامل الغازية Gaseous agents
٦. الصوابين والمنظفات Soap and detergents

♣ **الطرق الفيزيائية Physical methods :**

**1- التعقيم بالحرارة : يمكن توضيح اقسام التعقيم بالحرارة بالمخطط الاتي :**



### ٢. التلهيب لفترات قصيرة Short time flaming

تستخدم هذه الطريقة لتلهيب فتحات الأنابيب والقناني المختبرية وكذلك الماصات لمنع التلوث الجرثومي عند فتحها، حيث يتم التلهيب لفترة قصيرة دون الوصول إلى درجة الاحمرار.

## ١. الحرارة Heat

يعتبر التعقيم بالحرارة من أكثر الطرق استخداماً للسيطرة على الأحياء المجهرية وتستعمل الحرارة بشكليها الرئيسيين، الحرارة الجافة dry heat والحرارة الرطبة moist heat.

## أ- الحرارة الجافة

### ١. التلهيب حتى الاحمرار Flaming

وتستعمل مع الناقلة الجرثومية bacteriological loop or needle، نهايات الملقط forceps والمقصات scissors والشفرة الجراحية blade حيث تمرر الأدوات السابقة الذكر خلال اللهب إلى درجة الاحمرار ومن ثم تستخدم بعد تبريدها.

### ٣. فرن الهواء الحار Hot air oven

يستخدم فرن الهواء الحار لتعقيم المواد الزجاجية مثل أنابيب الاختبار وأطباق بتري والماصات ...الخ، بالإضافة إلى المواد المعدنية التي لا تتأثر بالحرارة الجافة. يستخدم لهذا الغرض فرن يعتمد على تدوير الهواء الساخن من خلال مراوح خاصة حيث تتراوح درجة الحرارة المستخدمة من ١٦٠ – ١٨٠ °م ولمدة ساعة واحدة.

**ب - الحرارة الرطبة**

وتقسم تصاعدياً حسب درجة غليان الماء إلى :

**١ . البسترة Pasteurization**

سميت نسبة إلى العالم لويس باستور، وتجري البسترة بدرجة حرارة ٦٢.٩ °م لمدة ٣٠ دقيقة وتدعى بطريقة المسك holding method أو بدرجة ٧١.٦ °م لمدة ١٥ ثانية وتدعى بطريقة الوميض flash method. تستخدم البسترة للقضاء على أغلب الجراثيم الممرضة وخصوصاً عصيات السل وبروسيلا الإجهاض وجراثيم السالمونيلا ولكن بالرغم من ذلك فإنها لا تقتل الابواغ.

**٢ . الغليان Boiling**

إن التسخين إلى درجة غليان الماء ١٠٠°م لمدة ٥ — ١٠ دقائق كافية لقتل الجراثيم الخضرية وقسم من الجراثيم المكونة للابواغ، تستخدم الغلايات Boilers لهذا الغرض، ومن عيوب هذه الطريقة أن هذه المواد تفقد بريقها وتتعرض للتآكل والصدأ بالإضافة إلى سرعة تلوثها بسهولة كونها غير مغلفة عند إخراجها من الغلاية.

**٣. التندلة Tyndalization**

- ويقصد بها التعقيم باستخدام الحرارة المتقطعة خلال فترة زمنية طويلة، حيث يتم تسخين المواد إلى درجة ١٠٠ °م باستخدام الحمام المائي أو البخار ولمدة ٣٠ دقيقة ومن ثم تحضن هذه المواد بدرجة ٣٧ °م لمدة ٢٤ ساعة وتكرر هذه العملية على مدى ٣ أيام متتالية.

- إن الغاية من هذه العملية هي السماح للابواغ الموجودة في المادة المراد تعقيمها بأن تتحول إلى الشكل الخضري عند الحضن بدرجة حرارة ٣٧ °م مما يسهل قتلها بدرجة ١٠٠ °م في اليوم التالي. تستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد والمحاليل التي تحتوي على السكريات التي تتأثر عند تعقيمها بالموصدة.

### ٤. التعقيم بالموصدة Autoclaving

يعتمد التعقيم بالموصدة على مبدأ استخدام الحرارة الرطبة ( البخار ) مع الضغط حيث توضع المواد المراد تعقيمها داخل جهاز الموصدة autoclave ( وهو عبارة عن قدر للضغط يتم به التحكم بالحرارة والضغط والزمن اللازم للتعقيم ) . **وتضبط الحرارة على درجة ١٢١ °م وضغط ١٥ باوند / انج ٢ ولمدة تتراوح بين ١٥ — ٣٠ دقيقة**، تستخدم هذه الطريقة لتعقيم معظم أنواع الأوساط الزرعية والملابس والمواد المطاطية التي تتلف باستخدام الحرارة الجافة.

### ٢. الترشيح Filtration

تستعمل المرشحات في تعقيم الأوساط والمحاليل التي تتأثر بالحرارة مثل الذيفانات toxins والأمصال المضادة ومحاليل السكريات والمضادات الحياتية ..الخ، حيث تعتمد على مبدأ الفصل بالترشيح إما من خلال الثقوب الصغيرة أو من خلال الالتصاق على أسطح المرشحات بسبب اختلاف الشحنات الكهربائية بين المواد المراد ترشيحها وسطح المرشح. إن فعالية المرشحات الجرثومية تتغير مع حجم ثقوبها كذلك مع الطبيعة الكيميائية للمادة ومقدار الضغط المستخدم عبر الترشيح.

## ٣- الإشعاع Radiation

إن التعقيم بالإشعاع ينقسم إلى نوعين أساسيين هما :

١- التعقيم بالأشعة المؤينة ionizing radiation وهي أشعة كهرومغناطيسية electromagnetic rays ذات أطوال موجية متناهية في القصر ( أقل من ١٠ – ٤٠ انجيستروم ) مثل الأشعة السينية X rays وأشعة كاما Gamma rays.

٢- التعقيم بالأشعة فوق البنفسجية ultraviolet light or U.V. light ذات الطول الموجي ( ٢٤٠٠ – ٢٨٠٠ انجيستروم ).

إن آلية عمل أشعة كاما غير معروفة بشكل كامل ولكن يعتقد بأنها تسبب الضرر الدائم للحامض النووي DNA بالإضافة إلى تأين ماء الخلية وتكوين جذور الهيدروكسيل الحر( HO، $HO_2$ ، $H_2O_2$ ) الذي يعتبر عامل مؤكسد قوي والتي تؤثر بدورها على الحامض النووي DNA . تستخدم أشعة كاما في تعقيم المواد التي تستخدم لمرة واحدة ( النبيذة ) disposable medical supplies مثل الحقن البلاستيكية plastic syringes وكذلك الكفوف الجراحية والمواد الصيدلانية التي تتأثر بالحرارة.

## ♣ الطرق الكيمياوية : Chemical methods

إن تأثير العوامل الكيمياوية chemical agents إما أن يكون قاتلاً للجراثيم bactericidal حيث يؤدي إلى قتل الجراثيم وإما أن يكون مثبطاً لنموها bacteriostatic حيث يعمل فقط على إيقاف نمو الجراثيم ومنع تكاثرها.

- إن المواد القاتلة للجراثيم عادة ما تستعمل كمطهرات disinfectants حيث تستخدم في تطهير المواد الغير حية مثل الأدوات والمعدات والأرضيات.
- في حين تستخدم المواد المثبطة للجراثيم كمضادات الإنتان antiseptics .

إن تركيز المطهر والفترة الزمنية التي تتعرض فيها الجراثيم للمعقم ودرجة الحرارة كمية التلوث كلها عوامل لها تأثير مباشر على كفاءة عمل العوامل الكيمياوية. ويمكن تقسيم أهم العوامل الكيمياوية إلى المجاميع التالية :

## ١. الفينول والفينولات Phenol and phenolic

- إن الفينول النقي لايستعمل حالياً وذلك بسبب تأثيره المخرش ورائحته الغير مقبولة إلا أنه الأساس لتطوير العديد من المطهرات التي تدعى بالمطهرات الفينولية والتي تضم الكريسولات cresols والديتول dettol والهيكساكلورفين hexachlorophene .

- إن الفينولات تعمل على الأغشية السايتوبلازمية للجراثيم ويسبب تسرب محتويات الخلية في التراكيز الواطئة وتسبب تخثر البروتين في التراكيز العالية.

## ٢. الكحولات Alcohols

- يعتبر الكحول الاثيلي والكحول الايزوبروبيلي ذا فعالية سريعة في قتل الجراثيم الخضرية والفطريات إلا أنها أقل فعالية ضد الابواغ.

- إن طبيعة عمل الكحولات هي تغيير طبيعة البروتين داخل الخلية الجرثومية كما يعمل مذيباً جيداً للمواد الدهنية في الغشاء الخلوي.

- إن استخدام تركيز ٧٠ % من الكحولات هو أكثر فعالية من التراكيز النقية ٩٩.٩ % وذلك يعود إلى أن إضافة الماء إلى الكحول يزيد من فعاليته.

- يمكن جعل الكحول قاتلاً للابواغ بإضافة ١ % من حامض الكبريتيك أو هيدروكسيد الصوديوم إلى محلول الكحول ٧٠ %.

## ٣. الهالوجينات Halogens

- تضم الهالوجينات عدة عناصر ولكن الكلور واليود فقط هي التي لها تأثير مطهر وتعتبر عناصر مؤكسدة.

- يستخدم الهايبوكلورات hypochlorite في صناعة المواد القاصرة bleaching agents المستخدمة في تعقيم أدوات صناعة الألبان، المجازر وحمامات السباحة.

- يستخدم اليود كصبغة بتركيز ١% ومن مساوئ اليود هي الحساسية واصطباغ الجلد وقد تم التغلب على هذه المشاكل من خلال إضافة بعض المواد المنظفة والتي تدعى بحاملات اليود.

- إن آلية عمل الهالوجينات تتمثل بأكسدة البروتينات الخلية الجرثومية وبالتالي موتها.

## ٤. المعادن الثقيلة Heavy metals

- إن معظم معقمات المعادن الثقيلة تحتوي على الزئبق والفضة وتشمل المركبات العضوية وغير العضوية لهذه المعادن.

- المثال الشائع هو المركب التجاري الميركروكروم mercurochrome المستخدم في تطهير الجروح .

- تستخدم مركبات الزئبق في الوقت الحاضر كمواد حافظة تبيد الجراثيم وتمنع نمو الفطريات في المستحضرات البيولوجية.

- إن آلية عمل المعادن الثقيلة هي تثبيط الخمائر حيث يعمل الزئبق مثلاً على الارتباط عكسياً بمجاميع السلفادريل SH في البروتينات الجرثومية مما يؤدي إلى تثبيط عمل هذه البروتينات وموت الخلية الجرثومية.

## ٥. العوامل الغازية Gaseous agents

- يعتبر الفورمالديهايد formaldehyde واوكسيد الاثيلين ethylene oxide من أكثر العوامل الغازية المستخدمة في التعقيم.
- إن آلية عملهما تتمثل بإحلال مجاميع الالكيل محل مجاميع الكربوكسيل COOH والسلفادريل SH والأمين $NH_2$ في الخمائر والحامض النووي.
- يتحرر الفورمالديهايد من محلول الفورمالين ٤٠ % ويستخدم في تطهير الغرف ومفقسات الدواجن والمواد التي تتلف بالحرارة مثل الأدوات المطاطية، كما يدخل في صناعة اللقاحات كقاتل للمزارع الجرثومية. ومن عيوبه أن قو اختراقه ضعيفة.
- يمتاز غاز اوكسيد الاثيلين بقوة اختراق اكبر ويستخدم الأخير في بصورة شائعة في تعقيم المواد الطبية والمختبرية التي تستخدم لمرة واحدة medical and laboratory disposables.

## ٦. الصوابين والمنظفات Soap and detergents

- هي مواد تقلل الشد السطحي وتمتاز بكونها مرطبة وقابلة للذوبان في بالماء.
- وتمتاز الصوابين والمنظفات بأهميتها في السيطرة على الجراثيم من خلال استحلاب الطبقة الدهنية الجلدية وإزالة الجراثيم المتموضعة فيها.
- من أهم هذه المركبات هي مركبات الأمونيوم الرباعية quaternary ammonium compounds التي تعمل على مهاجمة الغشاء الخلوي للجراثيم باعتباره يحتوي على الشحوم بالإضافة إلى تثبيط الخمائر.
- عادة ما تكون المنظفات مواد غير سامة وثابتة stable ورخيصة الثمن.

هناك طرق أخرى تجري لقتل الجراثيم وهي طرق مختبرية عادة ما تجرى أثناء القيام بالأبحاث وهي :

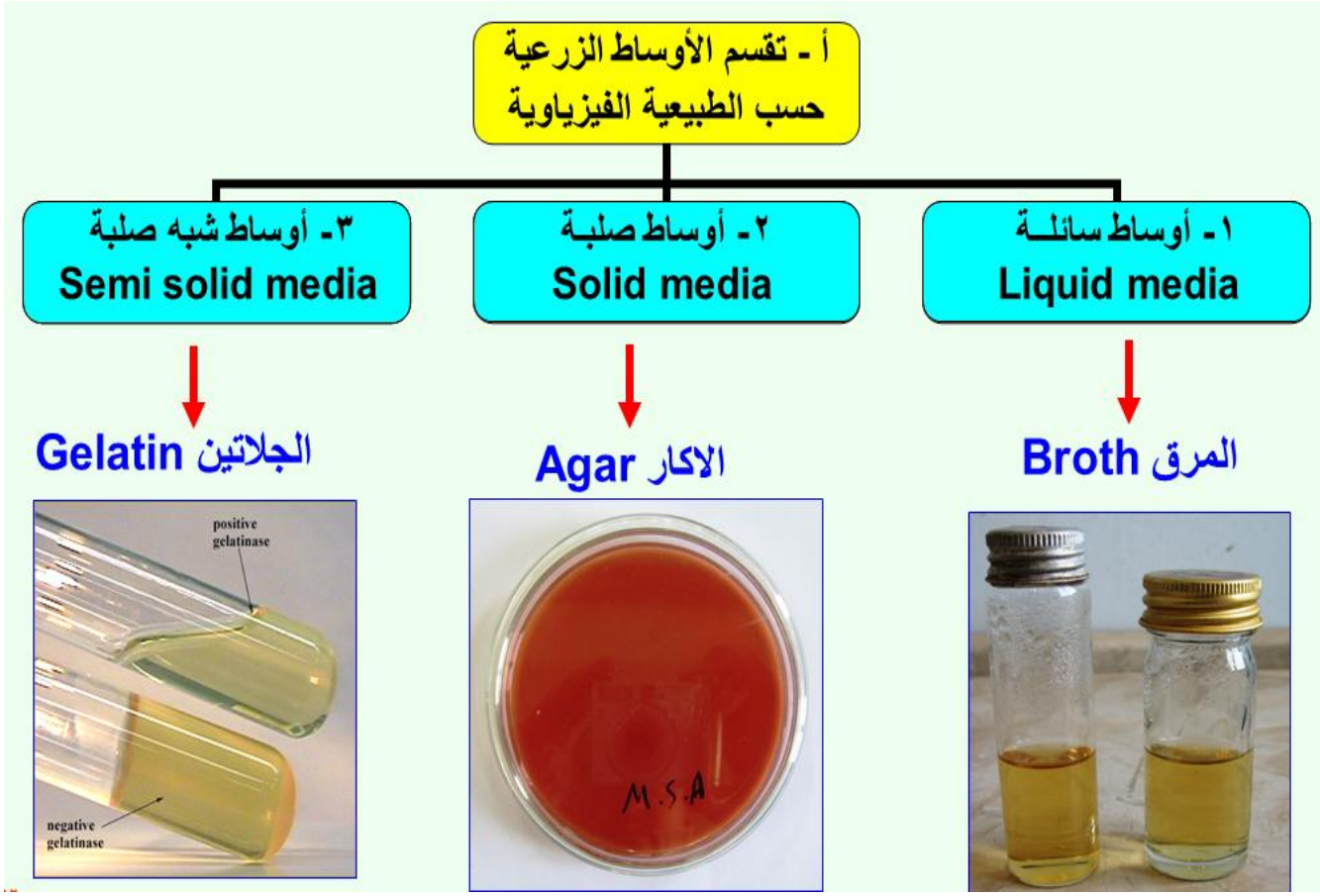
- تحطيم الجراثيم بالموجات فوق الصوتية.
- تحطيم الجراثيم بالتجميد والتذويب المتكرر.
- تحطيم الجراثيم بالموجات الحرارية تحت الحمراء.

## ♣ الاوساط الزرعية :

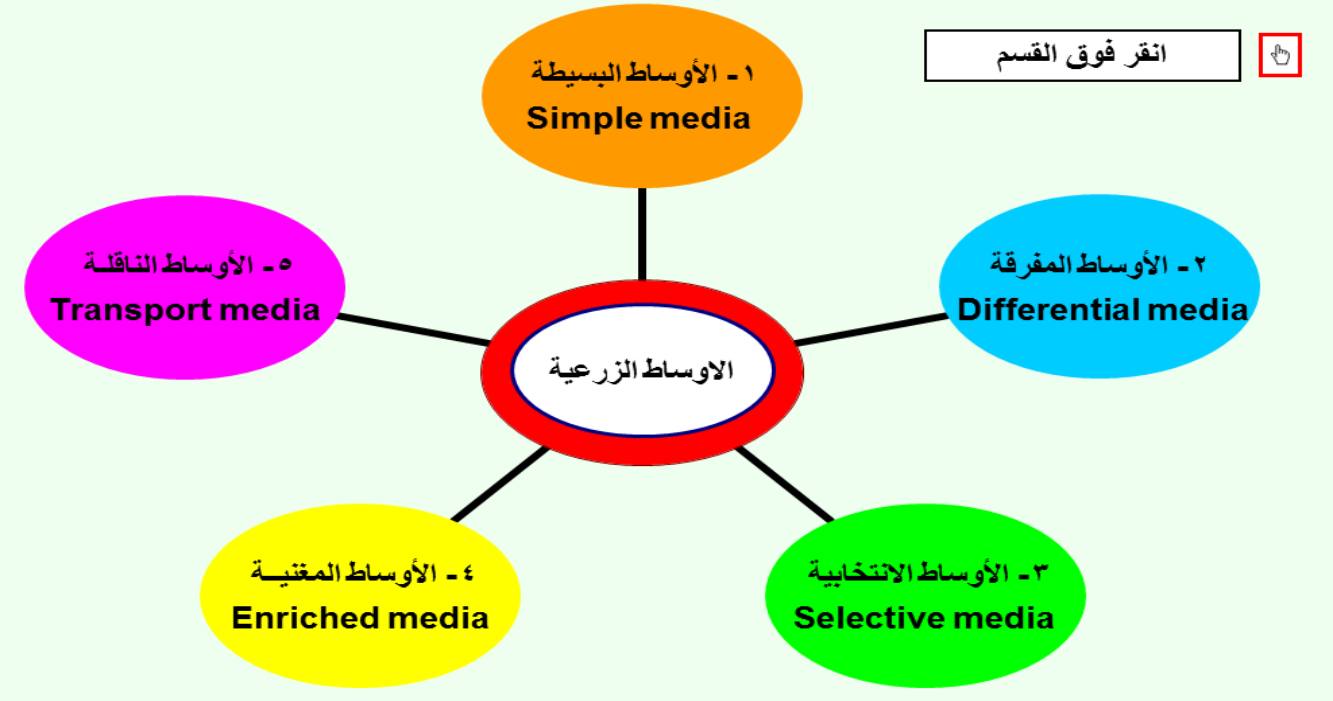
**يمكن تلخيص فوائد الأوساط الزرعية المستعملة في مختبرات الجراثيم بما يلي :**

- يتم بواسطتها عزل الجراثيم وتكثيرها وإدامتها بصورة نقية.
- تستعمل بعض الأوساط لنقل العينات السريرية وتعرف بالأوساط الناقلة.
- تساعد بعض الأوساط على دراسة بعض الخواص الحيوية وكذلك الوصف الحيوي والكيمياوي.
- وصف المظهر الزرعي للجراثيم النامية يساعد في التعرف عليها.
- تستعمل الأوساط في تحضير الجراثيم بكميات كبيرة والتي تستعمل بدورها في تحضير اللقاحات و المستضدات vaccines and antigens.

## ♣ تقسيم الاوساط الزرعية :



## ب - تقسيم الاوساط الزرعية حسب الغاية من استعمالها :




### 1- الاوساط البسيطة Simple media :

تحتوي هذه الاوساط على المواد الغذائية الأساسية كمصدر للنتروجين والكاربون وتنمو فيها معظم الجراثيم التي لاتحتاج إلى مواد غذائية نادرة أو معقدة، أمثلـة :

- المرق المغذي Nutrient broth
- ماء الببتون Peptone water
- الاكار المغذي Nutrient agar
-

### 2- الاوساط المفرقة Differential media

يمكن بواسطة هذه الأوساط التفريق بين أنواع الجراثيم مثل وجود سكر اللاكتوز في وسط الماكونكي فالجراثيم المخمرة تظهر بلون وردي أما الجراثيم غير المخمرة فتكون عديمة اللون أمثلـة :

- **أكار الماكونكي MacConkey agar:** يعمل على التفريق بين الجراثيم المخمرة لسكر اللاكتوز عن الجراثيم غير المخمرة لسكر اللاكتوز.

- **أكار الدم Blood agar:** يعمل على التفريق بين الجراثيم المحللة للدم عن تلك غير المحللة للدم ويتكون أكار الدم من الوسط الأساس blood agar base، ملح الطعام ، ببتون ثم يضاف له الدم المعقم بتركيز نهائي ٥ – ١٠ % . حيث تتم إضافة الدم بدرجة حرارة ٥٠ °م.

## 3- الاوساط الانتخابية Selective media :

تحتوي هذه الأوساط على مواد مثبطة للجراثيم الغير مرغوب فيها وفي نفس الوقت تعزز من نمو الجراثيم المراد عزلها، أمثلــة :

- **وسط بزموث سلفايت Bismuth Sulphite agar**

يستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم السالمونيلا Salmonella ، أهم مكونات الوسط هي الأخضر اللماع Brilliant green الذي يعمل كمثبط لنمو الجراثيم بالإضافة إلى احتواءه على كاشف Bismuth Sulphite indicator.

- **وسط سكر المانيتول والملح Mannitol Salt agar**

يستعمل هذا الوسط لعزل جراثيم المكورات العنقودية Staphylococci يتم تثبيط الجراثيم الاخرى باحتوائه على التركيز المرتفع من ملح الطعام NaCl كما يحتوى الوسط على سكر المانيتول الذي يعمل على التفريق بين جراثيم المكورات العنقودية المخمرة للسكر والذي يظهر بلون اصفر عن غير المخمرة للسكر والذي تظهر بلون أحمر Reddish.

- **وسط السالمونيلا والشايكلا Salmonella Shigella agar**

يستعمل هذا الوسط لتنمية جراثيم العصيات المعوية من جنس السالمونيلا والشايكلا ويحتوي على أملاح الصفراء والأخضر اللماع الذي يعمل على تثبيط الجراثيم الأخرى غير المرغوب فيها كما يحتوي على الثيوسلفيت لتوليد غاز كبريتيد الهيدروجين حيث تظهر المستعمرات المنتجة للغاز سوداء المركز.

## 4- الاوساط المغنية او الغنية Enriched media :

تنمو معظم أنواع الجراثيم على الأوساط البسيطة ولكن في بعض الأحيان هناك أنواع من الجراثيم قد تحتاج إلى مواد مغذية حيث يمكن إغناء الأوساط البسيطة بإضافة مواد غنية بالمواد العضوية والفيتامينات والخمائر والأملاح. أمثلــة على الأوساط المغنية.

- أكار الدم **Blood agar**
- أكار الشوكولاتة **Heated Blood agar ( Chocolate agar )**
- أكار نقيع المخ والقلب **Brain heart infusion agar**
- خلاصات الأنسجة الحيوانية أو سوائل الجسم **Tissue and body fluid's extract**
- أكار المصل **Serum agar**

## 5- الاوساط الناقلة Transport media :

إن هذه الأوساط تكون عادة بسيطة التركيب وفي الغالب تكون سائلة حيث تستعمل لنقل العينات من مناطق بعيدة وذلك للحفاظ عليها من الجفاف لحين وصول العينة إلى المختبر ومثال عليها وسط Stuart Transport medium.

♣ **امثلة على بعض الاوساط الزرعية ومكوناتها :**

**١- الاكار المغذي Nutrient agar**
يحتوى على : خلاصة اللحم ، خلاصة الخميرة، ببتون ، ملح طعام ، أكار أكار. وهو من الأوساط البسيطة.

**٢- المرق المغذي Nutrient broth**
يحتوي على : خلاصة اللحم ، خلاصة الخميرة ، ببتون ، ملح طعام ويعتبر من الأوساط البسيطة والسائلة.

**٣- ماء الببتون Peptone water**
يحتوي على : ببتون ، ملح الطعام NaCl. ويعتبر من الأوساط السائلة.

**٤- وسط أكار الماكونكي MacConkey agar**
يحتوي على : لاكتوز ، أملاح الصفراء Bile Salts ، ملح الطعام ، الأحمر المتعادل Neutral red ، ببتون ، أكار أكار ، ويعتبر من الأوساط التفريقية والأوساط الانتخابية.

**٥- أكار الدم Blood agar**
يحتوي على : الوسط الأساس الحاوي على كبد مهضوم ، خلاصة الخمائر ، ملح الطعام ويضاف له الدم المعقم بتركيز نهائي ٥ – ١٠ % الإضافة بدرجة ٥٠ °م بعد تعقيم الوسط. ويعتبر من الأوساط المغنية والتفريقية في نفس الوقت.

**٦ - أكار نقيع المخ والقلب Brain heart infusion agar**
يحتوي على : نقيع مخ العجل ، نقيع قلب العجل ، ببتون ، ملح الطعام ، دكستروز ، فوسفات الصوديوم ، أكار أكار. ويعتبر من الأوساط المغنية.

**٧- مرق نقيع المخ والقلب Brain heart infusion broth**
يحتوي على : نقيع مخ العجل ، نقيع قلب العجل ، ببتون ، ملح الطعام ، دكستروز ، فوسفات الصوديوم. ويعتبر من الأوساط المغنية والسائلة.

**٨- وسط الهلام أو الجلاتين Gelatin medium**
يحتوي على : خلاصة اللحم ، ببتون ،هلام. وهو من الأوساط الشبهة صلبة Semi Solid media.

**٩- وسط أكار سكر المانيتول والملح Mannitol salt agar**

يحتوي على : وسط أساس ، سكر المانيتول ، ملح الطعام ٥ – ٧ % ، الفينول الأحمر، البيتون ، أكار أكار. ويعتبر من الأوساط الانتخابية.

**١٠- وسط أكار السالمونيلا والشايكلا Salmonella Shigella agar**

يحتوي على : لاكتوز ، أملاح الصفراء ، ثيوسلفات الصوديوم ، سترات الصوديوم ، سترات الحديد ، الأخضر اللماع ، الأحمر المتعادل ، ببتون ، خلاصة اللحم ، أكار أكار. ويعتبر من الأوساط الانتخابية.

**١١- وسط أكار الايوسين والمثلين الأزرق Eosin Methylene blue agar**

يحتوي على : لاكتوز ، ايوسين ، المثلين الأزرق ، فوسفات البوتاسيوم ، ببتون ، أكار أكار. يعتبر من الأوساط الانتخابية.

**١٢- وسط أكار الأخضر اللماع Brilliant green agar**

يحتوي على : ببتون ، خلاصة الخميرة ، لاكتوز ، سكروز ، ملح الطعام ، الأخضر اللماع ، الفينول الأحمر ، أكار أكار. ويعتبر من الأوساط الانتخابية.

**١٣- وسط ثلاثي السكر والحديد Triple sugar Iron agar (TSI)**

يحتوي على : سترات امونيوم الحديد ، فينول الأحمر ، السستين ، لاكتوز ، كلوكوز ، سكروز ، ثيوسلفات الصوديوم ، ملح الطعام ، أكار أكار. يستخدم للكشف عن انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين $H_2S$.

**١٤- وسط لوينشتاين جينشن Lowenstein – Jensen medium**

يحتوي على الملاكايت الأخضر ، بيض ، كليسرول ، اسبارجين ، سترات المغنيسيوم ، سلفات المغنيسيوم ، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين. ويعتبر من الأوساط الانتخابية.

**١٥- أكار اليوريـا Urea agar**

يحتوي على : ببتون ، كلوكوز ، ملح الطعام ، فوسفات الصوديوم ، فوسفات البوتاسيوم ، الفينول الأحمر ، أكار أكار. يعقم الوسط ثم يبرد إلى ٥٠ درجة مئوية . يضاف إليه محلول ٢٠ % يوريا معقمة بالترشيح تركيز اليوريا النهائي ٥ %. يستخدم هذه الوسط للكشف عن أنزيم Urease الذي تنتجه بعض الجراثيم.

## ♣ طريقة تحضير الوسط الزرعي :

**1- وزن الوسط الزرعي . 2- اذابة الوسط باستخدام الحرارة مع التحريك . 3- التعقيم بالمؤصدة Autoclave 4- تبريد الوسط بعد تعقيمه . 5- تلهيب فوهة الفلاسك قبل الصب . 6- صب الوسط في طبق بتري . 7- تلهيب الوسط بعد الصب . 8- تلهيب غطاء بتري بعد الصب . 9- ترك الاكار يتصلب . 10- وضع الاطباق في اكياس لحين الاستعمال . 11- الحفظ في الثلاجة بشكل مقلوب**

## ♣ تنمية الجراثيم على الاوساط الزرعية Bacterial growth on synthetic media:

### ١ ـ تنمية الجراثيم في المزارع السائلة

إن أسهل طريقة للتعامل مع الجراثيم تتم في تنميتها في أنابيب اختبار تحوى على أوساط زرعية سائلة كوسط المرق المغذي nutrient broth ووسط نقيع المخ والقلب brain heart infusion medium، يظهر النمو في المرق المغذي على النحو التالي.

١. **عكارة turbidity :** تتفاوت في كثافتها حسب نوع الجرثومة وكمية الحقنة كما في جراثيم *E. coli* .

٢. **تكوين تجمع سطحي pellicle formation :** وهذه تمثل طبقة رقيقة من الخلايا ( قشرة ) تطفو على سطح المرق، كما في جراثيم العصيات *Bacillus* .

٣. **تكوين راسب sediment formation :** يظهر النمو على شكل راسب من الخلايا يستقر في قعر الأنبوب ولكنه يرتفع بشكل لولبي أو حلزوني عند رج الأنبوبة بهدوء، كما في جراثيم المكورات العنقودية *Staphylococcus* .

٤. **تكوين مخاط slime:** إذا لم ترتفع الخلايا المترسبة في القعر فيعني أن راسب الخلايا النامية مخاطية، كما في جراثيم *Kebsiella* .

٥. **تكوين الغاز gas :** يمكن التأكد من وجوده بمشاهدة فقاعات الغاز التي سوف تنتج عند مزج الأنبوب كما في جراثيم الايشركيا القولونية *E. coli* .

٦. **الخضاب الخارجي exopigmentation:** حيث يلاحظ تغير لون الوسط الزرعي كما في جراثيم الزوائف *Pseudomonas* .

### ٢ ـ تنمية الجراثيم في المزارع الصلبة

فوائد استخدام المزارع الصلبة :

- عزل الجراثيم عن بعضها لتكوين مستعمرات نقية منفردة single pure colonies وبالتالي يسهل التعامل معها وتشخيصها بسهولة ، والمستعمرة الواحدة تمثل النمو الناتج من انقسام خلية جرثومية واحدة.

الطرق المستعملة في تنمية الجراثيم على الأوساط الصلبة :

١ ـ طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method

٢ ـ طريقة الصب في الطبق Pour – plate method

٣ ـ النشر في الطبق Spreading – plate method

٤ ـ الاكار المائل Agar – slop method

**1- طريقة تخطيط الطبق Streak – plate method :**

- يتم بهذه الطريقة وضع النقلة الجرثومية على سطح الاكار قرب حافة الطبق ومن ثم تخطط باتباع إحدى الطرق الموضحة في الأشكال التخطيطية لاحقاً حيث يتم النقل والتخطيط باستخدام الناقلة المعقمة sterile loop.

- إن الخلايا المتكدسة مع بعضها في بداية التخطيط قد تؤدي إلى تكوين مستعمرات متصلة مع بعضها ولكن مع استمرار التخطيط لا يبقي إلى عدد قليل من الخلايا الجرثومية على الناقلة حيث يؤدي ذلك إلى تكوين مستعمرات منفردة في نهاية التخطيط (وتظهر نتيجة التخطيط بعد حضانة الطبق ونمو الجراثيم ).

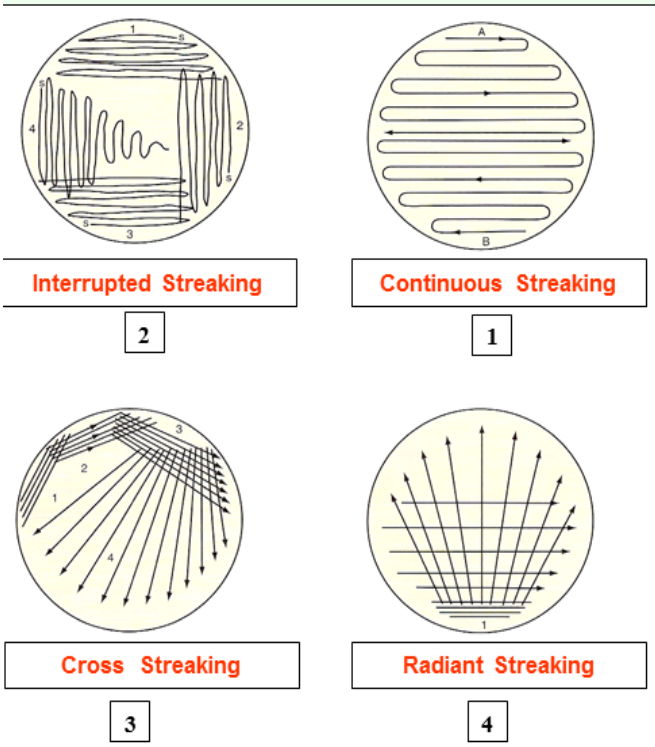
ومن الطرق الشائعة للتخطيط هي :

١. التخطيط المستمر Continuous Streaking

٢. التخطيط المتقطع Interrupted Streaking

٣. التخطيط المتقاطع Cross Streaking

٤. التخطيط الشعاعي Radiant Streaking




يتم تلهيب الناقلة كلما تم تغيير اتجاه الخطوط في الطريقة ( ٢ ، ٣ ، ٤ ) كي يقل عدد الخلايا ويتم الحصول على مستعمرات منفردة.

☺ ملاحظة : توضع الإطباق في الحاضنة بصورة مقلوبة أي الغطاء إلى الأسفل ، وذلك لان وضع الطبق بصورة اعتيادية ( أي الغطاء إلى الأعلى) وبوجود التراكيز العالية من الماء في الوسط الزرعي الصلب سوف يؤدي إلى تبخر الماء وتكدسه على السطح العلوي للطبق، ولذلك فان أي تحريك للطبق سيؤدي إلى انسياب قطرات الماء على سطح الاكار ودمج المستعمرات الجرثومية مع بعضها.

**2- طريقة الصب بالطبق Pour – plate method :**

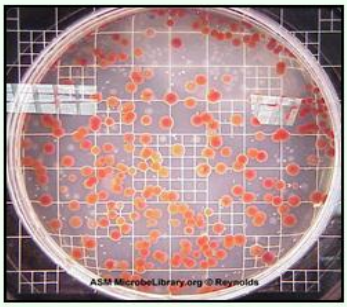
تستعمل هذه الطريقة للأغراض التالية :

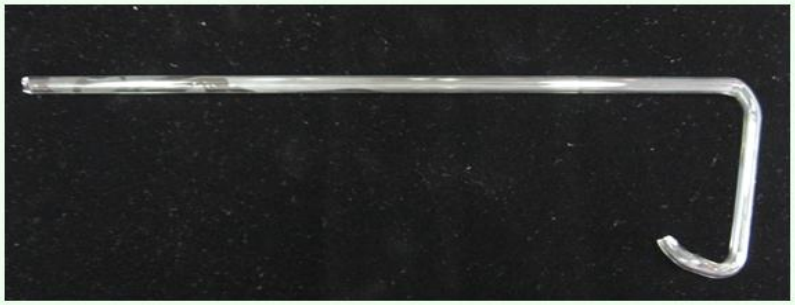
- دراسة نمط التحلل الدموي لمستعمرات الجراثيم المحللة للدم مثل Streptococci
- فصل المستعمرات الواحدة عن الأخرى بصورة أفضل مع نقاوة المستعمرة .
- تعداد الجراثيم الحية.

في هذه الطريقة يتم حقن الجراثيم أثناء فترة سيولة الاكار في درجة ٤٥ °م ومن ثم يصب في الطبق وبذلك تنتشر الجراثيم بعد المزج في كل الوسط وليس فقط على السطح مكونة مستعمرات منفردة في الاطباق .

### 3- طريقة النشر بالطبق Spreading – plate method

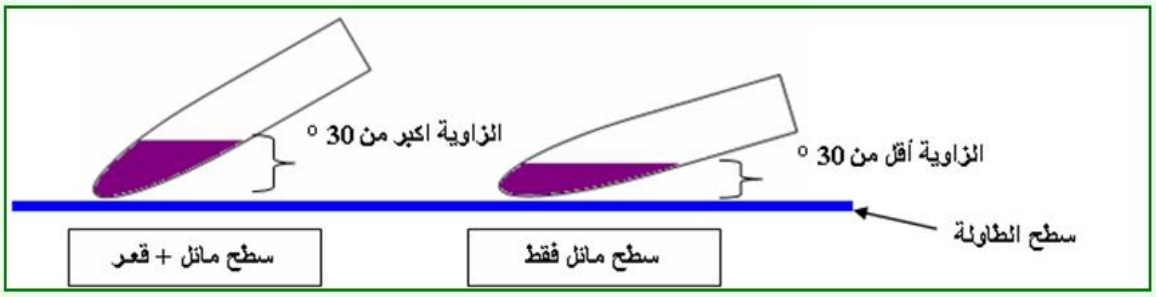
- توضع كمية ٠.١ مل من معلق الجراثيم المخفف على سطح الاكار قرب المركز ثم تنشر بواسطة ناشرة زجاجية معقمة بشكل حرف L أو بواسطة ماسحة قطنية cotton swap. ويفضل استعمال الأولى لأنها لاتمتص عالق الجراثيم .



### 4- الاكار المائل Agar – slop method :

- تفضل هذه الطريقة لحفظ الجراثيم ، كما تستعمل لمشاهدة تكوين الخضاب أو إنتاج الغازات.
- ويتم تحضير الاكار المائل بوضع أنبوب الاختبار الحاوي على وسط الاكار المغذي المعقم بصورة مائلة مرتفع الفوهة عن سطح الطاولة bench بما يقارب ٣٠ ° أو اقل إذا أريد الحصول على سطح مائل slant فقط .
- أما إذا أريد الحصول على سطح مائل بالإضافة إلى قعر slant - butt لزراعة الجراثيم بواسطة الطعن stabbing فيتم وضع الأنبوب الحاوي على الاكار المغذي بزاوية اكبر من ٣٠ °.

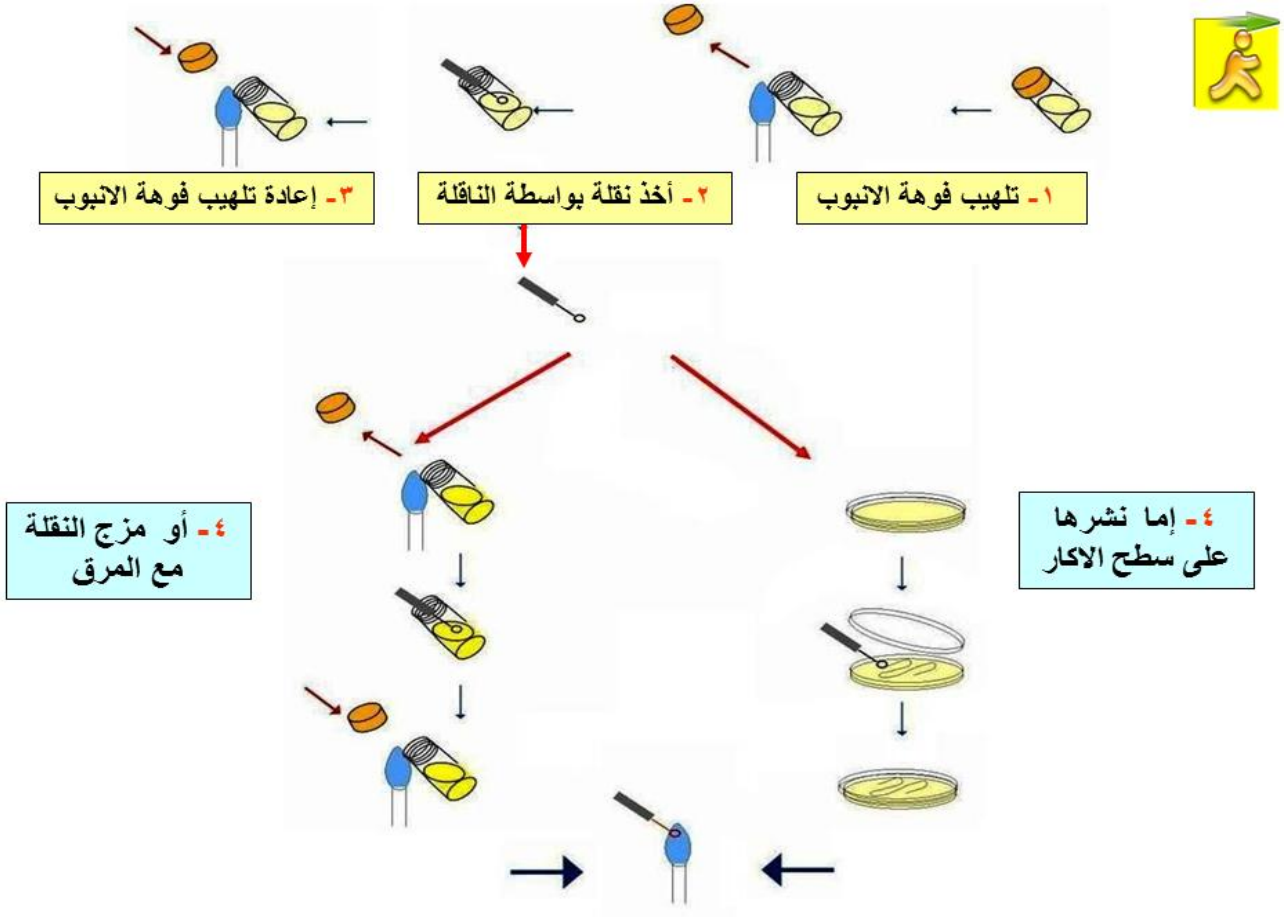


- **طريقة حقن الجراثيم على الاوساط الزرعية :**

عند تنمية الجراثيم على الأوساط الزرعية الصلبة أو السائلة تتم باتخاذ الاحتياطات والتدابير اللازمة للحفاظ على النقاوة وعدم التلوث وكما يلي :

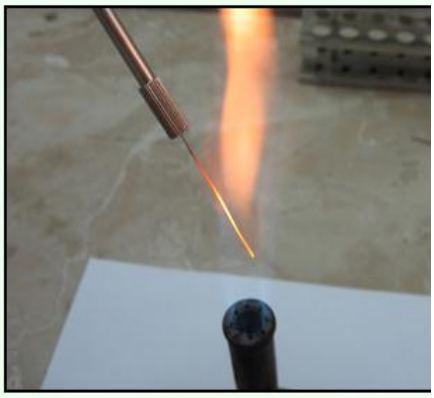
- تعقيم منطقة العمل باستخدام الكحول ٧٠ % وبحركة دائرية من المركز الى الخارج ومن ثم تلهيب السطح لفترات قصيرة.
- يجب تلهيب الإبرة الناقلة أو الحلقة الناقلة حتى الاحمرار وبهذا سوف يتم تحطيم كافة الجراثيم الملوثة ويجب الانتباه إلى تسخين الجزء السفلي من المقبض أيضاً لكي لا تدخل جراثيم ملوثة إلى قناني الاختبار .

- إثناء النقل يجب مسك الناقلة باليد اليمنى وكما يمسك القلم ، مع مسك الأنبوبة باليد اليسرى ترفع السدادة القطنية أو الغطاء بين أصابع اليد اليمنى أو الإصبع الصغير وراحة الكف مع مراعاة عدم وضع الغطاء أو السدادة على الطاولة ،كذلك يجب مسك الأنبوبة بصورة مائلة مع الأفق مع مراعاة عدم انسكاب الوسط الزرعي السائل، يجب أن يتم الحقن قرب اللهب لان تيارات الحمل من اللهب سوف تمنع دخول الجراثيم الملوثة إلى داخل الأنبوب.
- ضرورة تعقيم فوهات القناني والأنابيب المنقول منها واليها وذلك بتهليبها لفترة قصيرة قبل حقنها بالجراثيم.

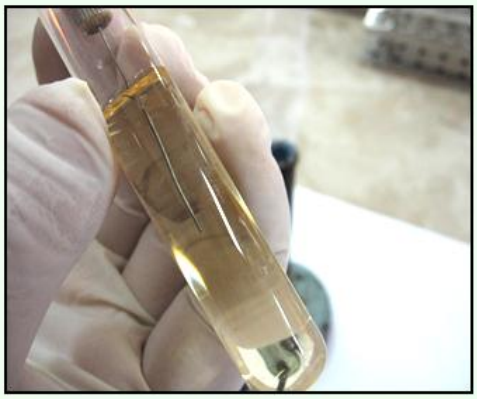


## ♣ النمو على الوسط شبه الصلب (مادة الجيلاتين المطعون) Growth in semi-solid medium

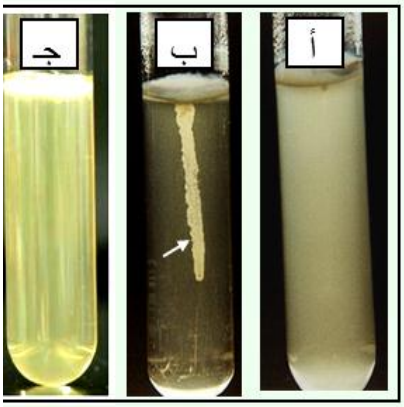
إن بعض الجراثيم تتصف بقابليتها على تمييع الجلاتين liquefaction of gelatin وتظهر هذه الصفة بعد حضانة قد تطول إلى أسبوع أو أكثر لذلك يجب وضع مواد مغذية وذلك لتعزيز نمو الجراثيم بالإضافة إلى الجلاتين ويستفاد من التنمية على وسط الجلاتين ايضاً لمعرفة حركة الجراثيم حيث يمكن معرفة فيما إذا كانت الجراثيم متحركة أم لا من خلال طعن الوسط باستخدام ابرة خاصة لذلك.



تعقيم ابرة الطعن بالتلهيب حتى الاحمرار

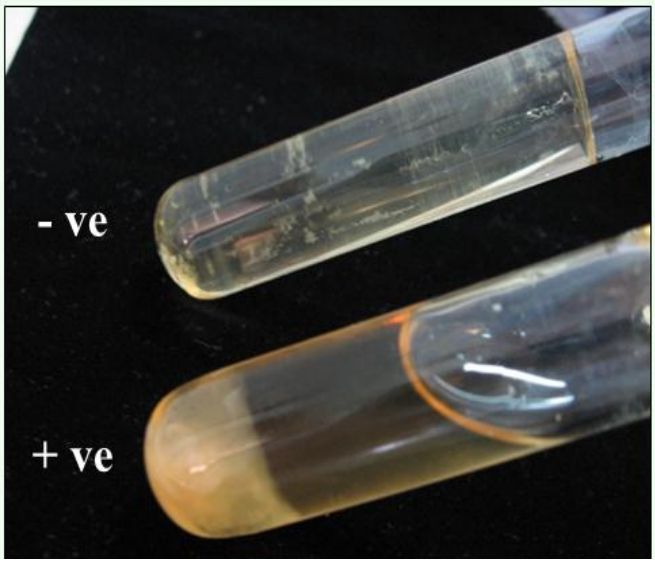


زرع وسط الجلاتين بواسطة ابرة الطعن




أ- الجراثيم متحركة
ب- الجراثيم غير متحركة
جـ الوسط غير مزروع

- يتم قراءة نتيجة نمو الجراثيم في وسط الجلاتين من خلال إمالة الوسط بعد تبريده (بعد انتهاء فترة الحضانة) حيث أن الجزء المتميع يتحول إلى سائل حتى بعد التبريد في حين يكون الجزء الغير متميع صلباً في درجة حرارة التبريد.



## المظهر المستعمري للجراثيم Colony morphology :

يتم تصنيف الجراثيم بإتباع سلسلة متتابعة من الخطوات التي تجرى على الجراثيم المزروعة والتي تؤدي بالنهاية إلى تشخيصها وهذه الطرق هي :

١. **المظهر المستعمري للجراثيم.**
وهو وصف المستعمرات النامية على الأوساط الصلبة.

٢. **المظهر الشكلي للجراثيم.**
ويتم بعمل مسحة smear من المستعمرات المعزولة وفحصها باستخدام الصبغات البسيطة والمفرقة.

٣. **النمو في الوسط المطعون شبه الصلب أو وسط الجلاتين.**
وذلك لمشاهدة الحركة الجرثومية وتميع الجلاتين.

٤. **النمو في الوسط السائل.**
وذلك لمشاهدة نمط النمو.

٥. **النمو على أكار الدم.**
لمشاهدة التحلل الدموي.

٦. **مقاومة الجراثيم للحرارة.**
تؤخذ درجات الحرارة ٥٦ ، ٦٠ ، ٨٠ ، ١٠٠ °م على التوالي لمعرفة مدى مقاومة الجراثيم لها.

٧. **الصفات الأيضية.**
مثل حاجة الجراثيم إلى $O_2$ ، $CO_2$، الحرارة ، وإنتاج الخضاب وغيرها.

٨. **التفاعلات الكيموحيوية.**
وهي مجموعة من الاختبارات التي تعتمد على قابلية الجرثومة على إنتاج خمائر معينة والتي يمكن من خلالها التفريق بين مجاميع الجراثيم عن بعضها.

## ♣ وصف المستعمرات الجرثومية على الوسط الصلب :

| | | |
|---|---|---|
| ١ . | الشكل | Shape |
| ٢ . | الحجم | Size |
| ٣ . | الارتفاع | Elevation |
| ٤ . | الحافة | Edge |
| ٥ . | التركيب السطحي | Surface structure |
| ٦ . | اللون والعتامة | Color and opacity |
| ٧ . | التحلل الدموي | Blood hemolysis |
| ٨ . | القوام | Consistency |
| ٩ . | قابلية الاستحلاب | Emulsifiability |
| ١٠ . | الظواهر | Phenomena |
| ١١ . | الخضاب | Pigmentation |
| ١٢ . | الرائحة | Odor |

### 1- الشكل Shape :

ويقصد به الوصف العام للمستعمرة وذلك من خلال النظر بشكل عمودي من الأعلى وسوف تظهر الأشكال التالية :

- دائرية **Circular**
- غير منتظمة **Irregular**
- شعاعية **Radiated**
- جذرية **Rhizoid**
- خيطية **Filamentous**

### 2- الحجم Size :

ويقصد به قطر المستعمرة بالمليمتر حيث يقسم الحجم إلى ٣ أقسام رئيسية هي :

### A – صغيرة جداً Very small :

**تسمى برأس الدبوس Pin head و عادة ما يكون حجمها اقل من 1 ملم .**

### B- متوسطة الحجم Medium size :

**حجم المستعمرات يتراوح ما بين 1-2 ملم .**

**C – كبيرة الحجم Large size :**

**يكون حجم هذه المستعمرات اكبر من 3ملم مثل مستعمرات العصيات حيث يصل قطرها الى 5 ملم او اكثر .**

**3- الارتفاع Elevation :**

ويقصد به ارتفاع سطح المستعمرة من الوسط ويكون بعدة أنواع :

- مسطح Flat
- مرتفع Raised
- قليل التحدب Low convex
- محدب أو شكل القبة Convex , Dam
- توجد حلمة Umbonate
- توجد عدة حلم Umblicate ،Papillate

**4- الحافة Edge :**

- كاملة Entire
- متموجة Undulate
- مفصصة Lobate
- تاجية Crenate
- مسننة Dentated
- مجعدة Curled
- مهدبة Fimbriate
- جذرية Rhizoid

**5- التركيب السطحي Surface structure :**

- املس Smooth . – حلقي Ringed
- خشن Rough . – حلمي Papillate .
- حبيبي Granular .

## 6- اللون و العتمة Color & opacity

ويقصد باللون والعتامة هو النظر إلى المستعمرة من خلال تسليط ضوء على سطح المستعمرة بالإضافة إلى النظر إليها من خلال تسليط الضوء على الجهة الخلفية من طبق بتري (خلف المستعمرة) حيث يمكن إدراج صفات العتامة كما يلي :

- شفافة Transparent
- نصف شفافة Translucent
- معتمة Opaque
- متألقة Fluorescent
- معدنية اللمعة Metallic sheen

## 7- التحلل الدموي Blood hemolysis :

ويقصد به قابلية الجرثومة على تكسير كريات الدم الحمراء RBC ويمكن ملاحظة هذه الصفة فقط عند نمو الجراثيم على أكار الدم حيث يمكن ملاحظة ٣ أنماط من التحلل الدموي :

أ- التحلل الدموي ألفا Alpha ( α ) Hemolysis

يكون نمط التحلل الدموي جزئياً partial hemolysis حيث يتصف بوجود منطقة مخضرة من التحلل الجزئي حول المستعمرات النامية وذلك نتيجة اختزال الهيموكلوبين hemoglobin في كريات الدم الحمراء إلى ميتهيموكلوبين methemoglobin.

**ب- التحلل الدموي بيتا Beta ( β ) Hemolysis**

يكون نمط التحلل الدموي كاملاً حيث complete hemolysis يتصف بوجود منطقة رائقة وشفافة من التحلل الدموي الكامل.

**ج- التحلل الدموي كاما Gamma ( γ ) Hemolysis**

لا يوجد أي تحلل دموي

No hemolysis

**8- القوام Consistency :**

ويقصد به الصفة التي تتمتع بها المستعمرة في حالة ملامستها بالناقلة الحلقية bacteriological loop حيث يمكن ملاحظة الصفات التالية :

- زبدية القوام Butyraceous
- لزجة Viscid
- هشة Friable
- غشائية Membranous

**9- قابلية الاستحلاب Emulisifiability :**

ويقصد به قابلية المستعمرة على التجانس مع الماء حيث يمكن ملاحظة الصفات التالية عند أخذ جزء من المستعمرة ومزجه مع كمية قليلة من الماء.

- سهل أم صعب Easy or Difficult
- متجانس أم حبيبي Homogenous or Granular
- غشائي Membranous

**10- الظواهر Phenomena :**

تتصف بعض الجراثيم بقابليتها على إحداث بعض الظواهر العيانية مثل ظاهرة العج swarming والتي تحدثها جراثيم المتقلبات *Proteus* في الأوساط المغذية حيث يتصف نموها بما يشبه الأمواج نتيجة تكاثر الجراثيم وهجرتها باتجاه خارج مركز المستعمرة ( يمكن التغلب على هذه الظاهرة بزيادة نسبة الاكار في الوسط إلى ٥ % ).

أما الظاهرة الأخرى فهي ظاهرة رأس الميدوزا ( الشعر المجعد ) medusa head والتي تنتجها جراثيم العصيات *Bacillus* حيث يمكن مشاهدة هذه الظاهرة بوضوح من خلال فحص المستعمرات بالمجهر الضوئي باستخدام العدسة الشيئية الواطئة قوة تكبير 4 x حيث تظهر حافات المستعمرات على شكل خصائل الشعر المجعد وهي عبارة عن سلاسل من جراثيم العصيات.

**11- الخضاب Pigmentation :**

تنتج العديد من الجراثيم الخضاب وتكون هذه المواد المنتجة على نوعين أساسيين الأول أن تكون خارج جسم الجرثومة exopigment مثل الخضاب الذي تنتجه جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* حيث تنتج نمطين من الخضاب البايوسايانين pyocyanin والذي يكون الأخضر المزرق، والأخر فهو خضاب الفلورسين fluorescein الذي يكون الأصفر المخضر.

أما النوع الثاني فهو الخضاب داخل جسم الجرثومة endopigment مثل جراثيم المكورات العنقودية حيث تنتج ٣ أنماط هي :

- **الخضاب الذهبي تنتجه المكورات العنقودية الذهبية** ***Staphylococcus aureus***
- **الخضاب الأصفر تنتجه المكورات العنقودية الصفراء** ***Staphylococcus citrus***
- **الخضاب الأبيض تنتجه المكورات العنقودية البيضاء** ***Staphylococcus albus***

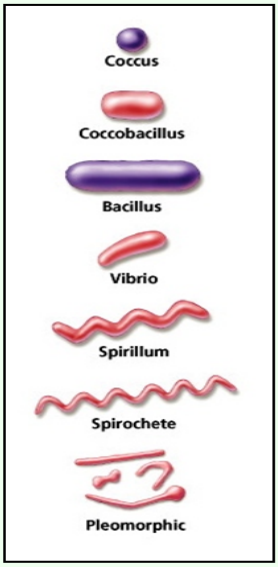
**12- الرائحة Oder :**

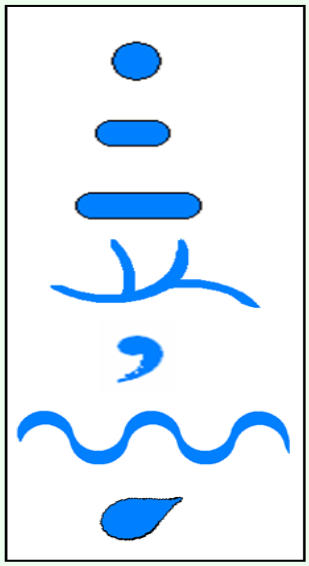
إن نمو الجراثيم على الأوساط الزرعية يؤدي إلى إنتاج مواد أيضية ذات رائحة مميزة لتلك الجراثيم مثل. رائحة التفاح المتفسخ والتي تنتجها جراثيم الزوائف *Pseudomonas* ورائحة السمك المتعفن التي تنتجها جراثيم المتقلبات *Proteus* .

## المظهر المجهري للبكتريا Bacterial morphology :

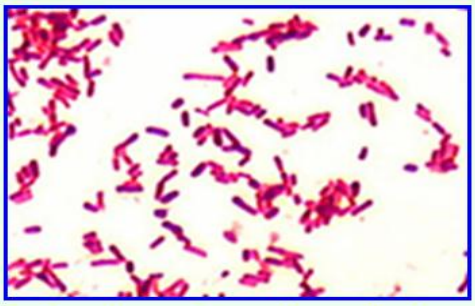
يتطلب فحص الجراثيم بالمجهر الضوئي إعطاء أوصاف لتلك الجراثيم من اجل تفريقها عن غيرها وبالتالي سهولة تشخيصها وتتضمن تلك الصفات :

### 1- الشكل Shape :

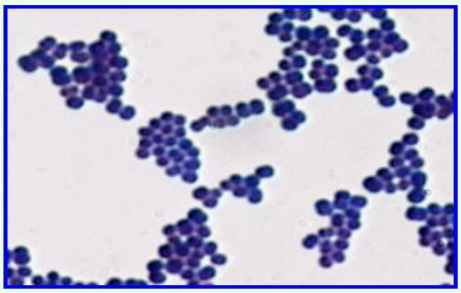


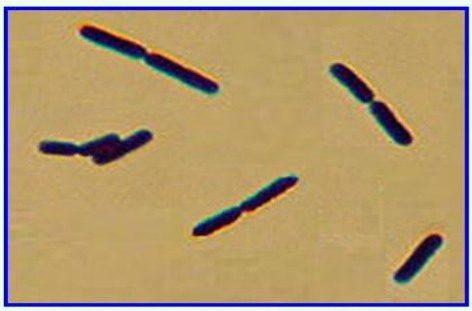
- كروية Coccus
- عصيات قصيرة Short rods
- عصيات طويلة Long rods
- خيطية Filaments
- ضمات ، منحنيات Comma shape
- حلزونية أو لولبية Spirals
- هراوية Club



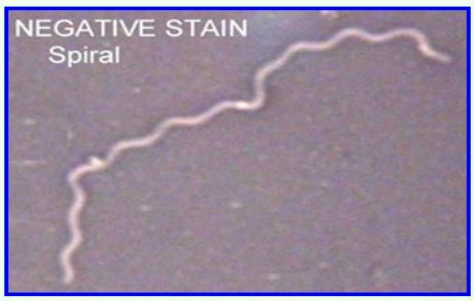
short rods عصيات قصيرة



coccus كروية

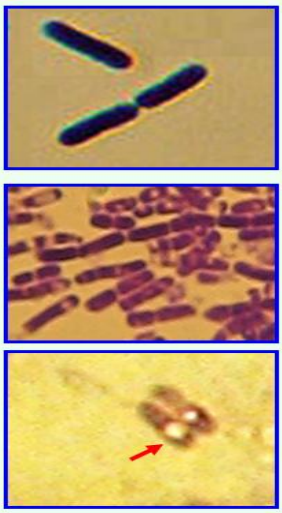


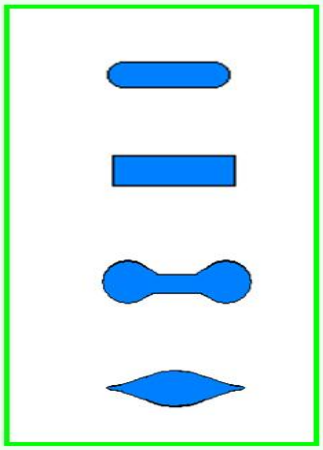
long rods عصيات طويلة




spirals حلزونية أو لولبية

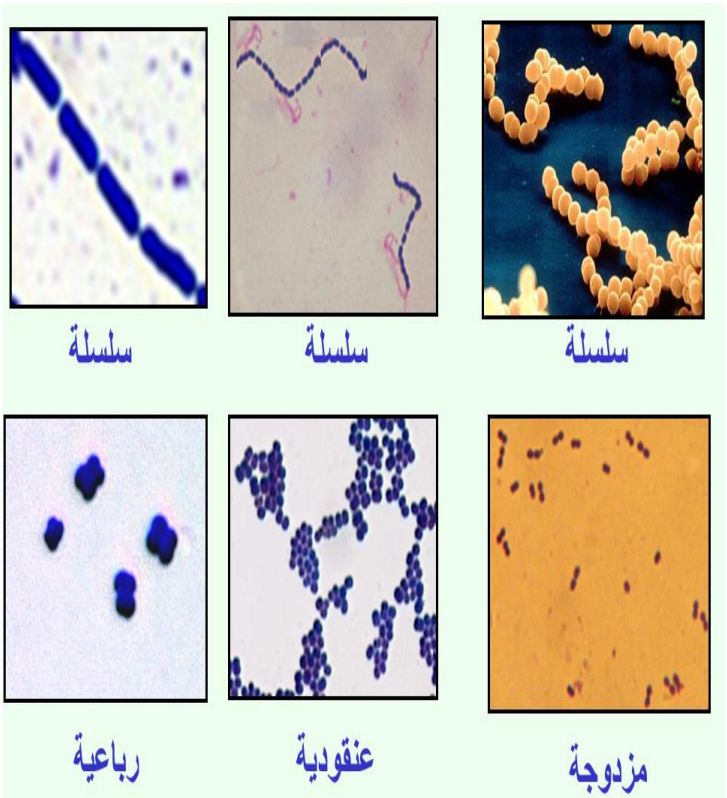
**2- النهايات Ends :**





- مدورة
- مقطوعة
- منتفخة
- مدببة

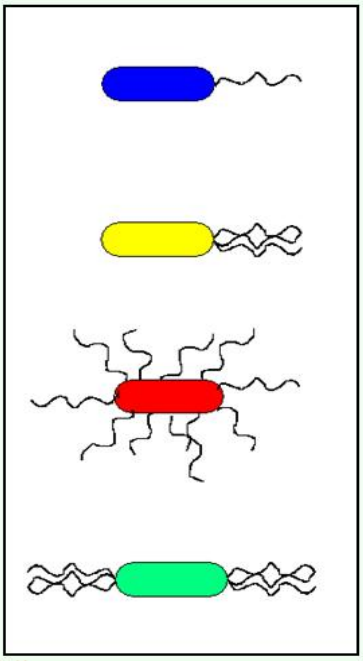
**3- الترتيب Arrangement :**




- منفردة
- مزدوجة
- سلسلة
- رباعية
- عنقودية
- حزم
- أحرف صينية

## 4- الحركة و الاسواط Motility and flagella :

الجراثيم إما أن تكون متحركة أو غير متحركة وتعتبر الاسواط من التراكيب المهمة لحركة الجراثيم ويكون ترتيبها بعدة أشكال هي :

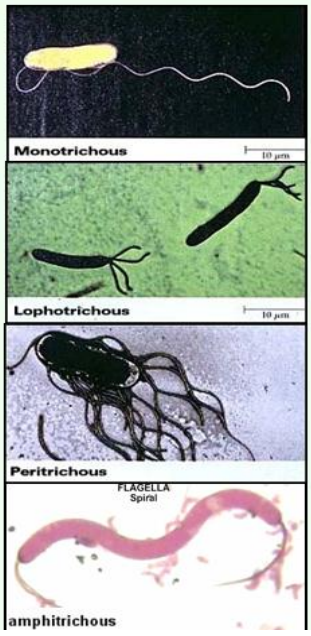


monotrichous

lophotrichous

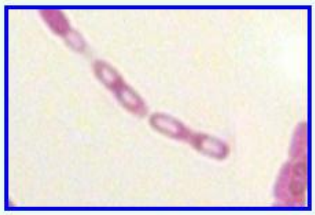
peritrichous

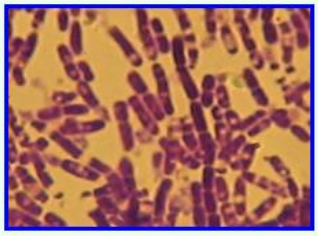
amphitrichous

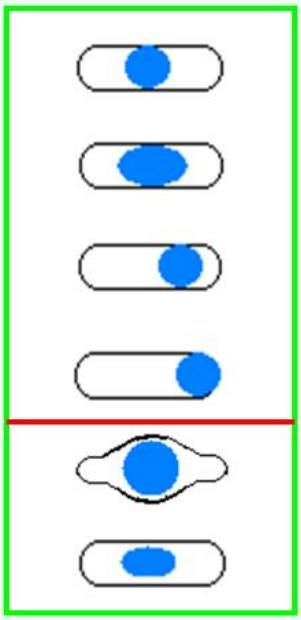



## 5- الابواغ Spores :

تختلف الابواغ في شكلها ومواقعها وحجمها بالنسبة إلى جسم الخلية الجرثومية وطبقاً لهذه المواصفات فإن الابواغ تكون كالتالي :

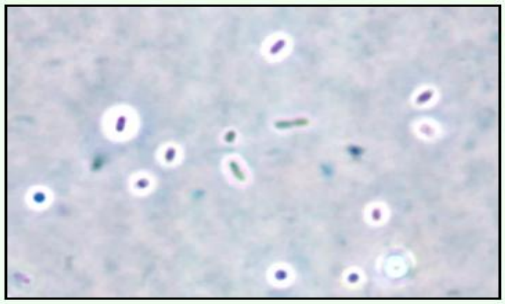


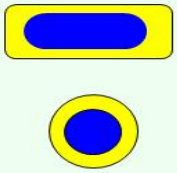




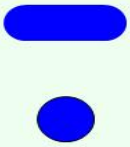
- كروية وسطية
- بيضوية وسطية
- كروية تحت طرفي
- كروي نهائي
- تسبب انتفاخ الخلية
- لا تسبب انتفاخ الخلية

**6- المحفظة Capsule :**





المحفظة موجودة



المحفظة غير موجودة

**7- التصبيغ Staining :**

ويقصد به توزيع الصبغة وتجانسها في الخلية الجرثومية وتكون بعدة أنماط وهي :

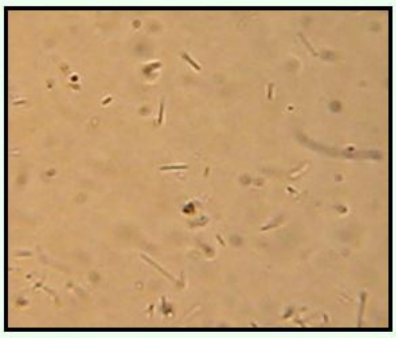
متساو **Even**

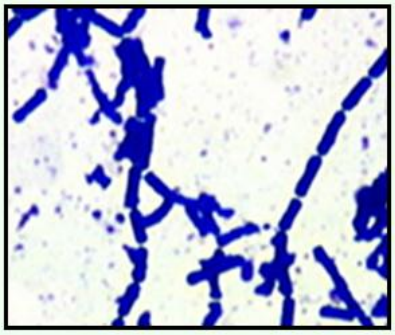
غير متساو **Uneven**

محبب في القطبين **Bipolar**

وجود حبيبات **Metachromatic granules**

## ♣ تصبيغ البكتريا Bacterial staining :





يمكن فحص التركيب الشكلي وتجمعات الجراثيم بطريقتين :

١. بمشاهدة الجراثيم الحية الغير مصبوغة وكما شاهدنا ذلك في فحص الحركة الجرثومية.

٢. بواسطة مشاهدة خلايا الجراثيم الميتة والمصبوغة بالصبغات المستعملة في تصبيغ الجراثيم .

- إن تصبيغ الجراثيم يجعلها متمايزة contrast أو مرئية بصورة واضحة بواسطة اللون الذي اكتسبته والذي يميزها عن محيطها وبذلك يمكن مشاهدتها بسهولة.

تقسم الصبغات المستعملة في تصبيغ الجراثيم إلى ثلاثة مجاميع :

### ١) الصبغات البسيطة Simple stains

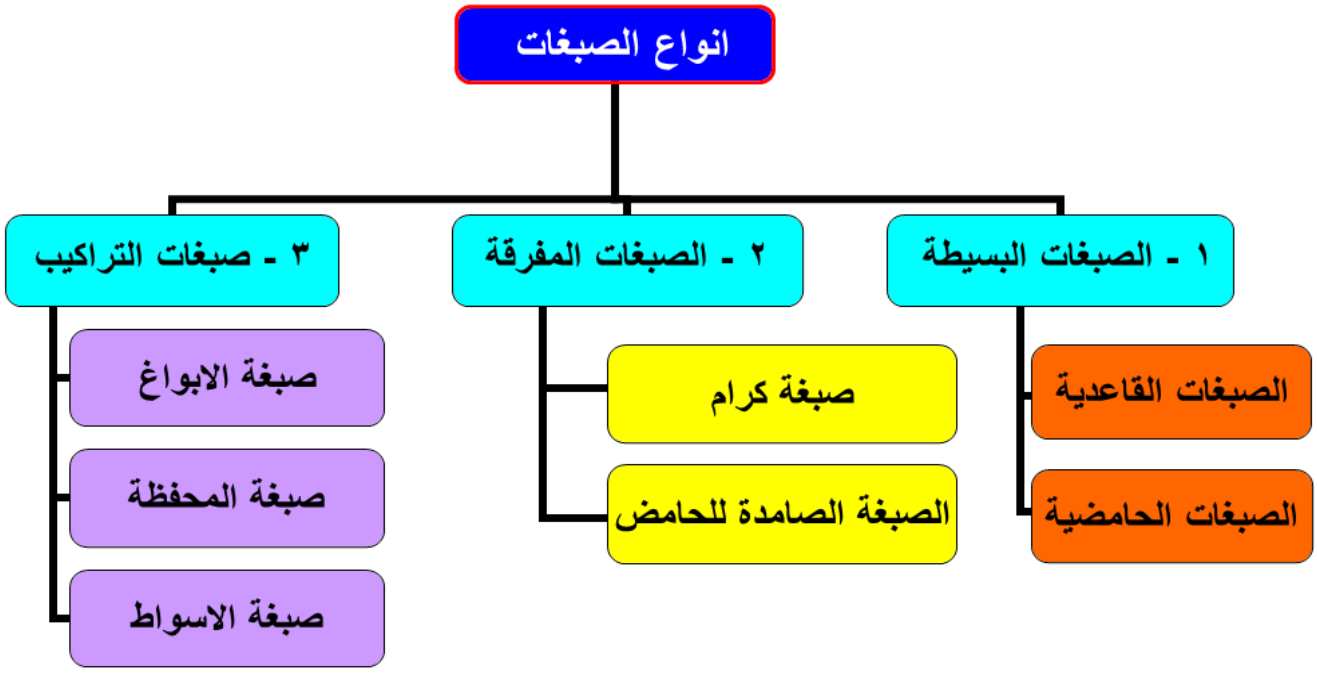
- الصبغات القاعدية Basic dyes
- الصبغات الحامضية Acidic dyes

### ٢) الصبغات المفرقة ( المركبة ) Differential ( Compound ) stains

- صبغة كرام Gram's stain
- الصبغة الصامدة للحامض Acid fast stain

### ٣) صبغات التراكيب Structural stains

- صبغة الابواغ Spore stain
- صبغة المحفظة Capsule stain
- صبغة الاسواط Flagellar stain




## 1- الصبغات البسيطة Simple stain :

### أ- الصبغات القاعدية : Basic dyes

- تتركب الصبغة من أملاح حيث يحتوي المركب الملحي على أيونات سالبة وأيونات موجبة، **إن وجود اللون في الأيون الموجب من الصبغة يعني أن الصبغة قاعدية**
- مثال على ذلك صبغة المثيلين الأزرق Methylene blue التي تتكون من كلوريد المثيلين ألأزرق Methylene blue chloride والذي يتحلل كما يلي :

$$MB\ Cl \longrightarrow MB^{+} + Cl^{-}$$

- حيث أن اللون ألأزرق يكون موجود في أيون الشحنة الموجبة $MB^{+}$ وبما أن خلايا الجراثيم تكون ذات شحنات سالبة لذلك تتحد شحناتها مع الشحنة الموجبة الزرقاء فتصطبغ الخلية الجرثومية باللون ألأزرق.

### ب - الصبغات الحامضية : Acidic dyes

- تعتبر الصبغة حامضية **إذا كان اللون في الايون السالب** مثل صبغة النجروسين Nigrosin والحبر الهندي Indian ink اللتان تستخدمان لصبغ المحفظة الجرثومية.

- ومن فوائد الصبغات البسيطة التعرف على شكل الجرثومة ، حجمها ، ترتيبها كذلك تمكننا من التعرف على التشخيص المبدئي لبعض الجراثيم مثل *Pasteurella* حيث تصطبغ نهايات الجرثومة وهذا ما يدعى بثنائية القطب bipolar staining .

## ♣ طريقة التصبيغ Staining method :

١. **اغمر الشريحة الزجاجية بمحلول الكحول الاثيلي ٥٠ %** لإزالة الأوساخ والطبقة الشمعية الموجودة على الشريحة ثم امسحها بقطعة قماش نظيفة وجافة كما يمكن أن تمرر الشريحة فوق اللهب للتأكد من إزالة الطبقة الشمعية.

٢. **ضع بواسطة الحلقة الناقلة قطرة صغيرة من المزرعة الجرثومية السائلة على الشريحة الزجاجية** ، أما إذا أخذت الجراثيم من مستعمرة جرثومية نامية على وسط صلب ففي البداية توضع قطرة صغيرة من الماء على الشريحة وتمزج مع نقلة صغيرة جداً من المستعمرة الجرثومية.

٣. **أنشر النقلة على الشريحة لتكوين طبقة رقيقة** ، ويجب الانتباه إلى عدم جعل المسحة سميكة لأنها سوف تكون معتمة للضوء.

٤. **تجفف المسحة بالهواء** أو بوضع الشريحة الزجاجية على مجففة الشرائح Slide dryer .

٥. **تثبت المسحة** وذلك بتمرير الشريحة الزجاجية ثلاث مرات فوق اللهب وبسرعة معقولة مع الانتباه إلى وضع الطبقة الجرثومية إلى الأعلى. فإذا لم تثبت بصورة جيدة فأن الغشاء المتكون سوف يزال أثناء التصبيغ.

٦. **تضاف الصبغة المراد استعمالها مثل.**

| | |
|---|---|
| المثيلين الزرقاء | Methylene blue |
| البنفسج البلوري | Crystal violet |
| الكاربول فوكسين | Carbol fuchsin |
| السفرانين | Safranin |

٧. **تغسل الشريحة بالماء الهادئ** ، ثم تجفف ، وتفحص بالعدسة الزيتية .

☺ **ملاحظة :** إن الغاية من تثبيت الجراثيم هو لقتل الجراثيم، حيث تعمل الحرارة على تجلط بروتوبلازم الخلية الجرثومية ، والتصاق الخلية الجرثومية على الشريحة الزجاجية مما يؤدي إلى تثبيتها على الشريحة وعدم زوالها أثناء معاملتها بالصبغات أو غسلها بالماء.

## 2- الصبغات المفرقة (التفريقية) (المركبة) Differential stain (Compound) :

- سميت هذه الصبغات بالصبغات التفريقية لكونها تفرق بين أنواع الجراثيم المختلفة اعتماداً على قابليتها على الاحتفاظ بنوع معين من الصبغات دون الأخرى كذلك سميت بالصبغات المركبة كونها تعتمد على أكثر من نوع من الصبغات لإظهار التمايز بين الجراثيم المختلفة.

### أ- صبغة كرام : Gram stain

في عام ١٨٨٤ استطاع العالم Christian Gram من اكتشاف وتطوير صبغة سميت باسمه والتي من خلالها تم تقسيم الجراثيم إلى زمرتين رئيسيتين هما :

- الجراثيم موجبة الكرام ( G+ ) Gram positive bacteria
- الجراثيم سالبة الكرام (G - ) Gram negative bacteria

- إن الجراثيم الموجبة الكرام تحتفظ باللون البنفسجي ( الصبغة الأولية ) بعد قصرها بالكحول ، أما الجراثيم سالبة الكرام فأنها لا تحتفظ باللون البنفسجي بعد قصرها بالكحول ولذلك تصطبغ بالصبغة المضادة فتظهر باللون الأحمر.

- إن هذا الاختلاف في التصبيغ يعزى إلى الاختلاف في مكونات الطبقات السطحية أو مكونات الجدار الخلوي للخلايا الجرثومية .

- إن جدار الخلية في الجراثيم موجبة الكرام ( G + ) تتكون من طبقة سميكة من مادة الببتيدوكلايكان peptidoglycan الذي يعمل كحاجز يحتفظ باللون الأرجواني للصبغة البنفسجية crystal violet ولا يزال اللون حتى بعد استعمال القصر بالكحول alcohol.

- أما الجراثيم السالبة الكرام ( G - ) تتكون من طبقة خفيفة من الببتيدوكلايكان وتغلفها من الخارج طبقة من البروتين ومتعدد السكريات lipopolysaccharide والتي لا تستطيع الاحتفاظ باللون ألأرجواني للصبغة البنفسجية crystal violet مما يؤدي إلى زوال الصبغة عند قصرها بالكحول وبذلك تأخذ اللون المضاد وهو اللون الأحمر لصبغة السفرانين safranin.

## ♣ المحاليل المكونة لصبغة كرام :

١. **صبغة قاعدية basic stain :** وتتمثل في البنفسج البلوري crystal violet أو الجنشن البنفسجي gentian violet .

٢. **مثبت للصبغة mordant dye :** وقد تكون أحماض أو قواعد أو أملاح معدنية أو أيودين. ويعمل هذا المثبت على زيادة التصاق وتثبيت الصبغة بجدار الخلية الجرثومية.

٣. **عامل مزيل للصبغة ( قاصر) decolorizing agent :** ويتمثل بالكحول الاثيلي ethanolبتركيز ٩٥ % حيث يعمل على إزالة الصبغة من الخلية المصبوغة.

٤. **صبغة مغايرة counter stain :** وتتمثل بصبغة السفرانين safranin أو أي صبغة تختلف في لونها عن الصبغة ألأولى لإعطاء الخلية التي فقدت الصبغة بعد معاملتها بالكحول لون مغاير ، إن الجراثيم التي لم تفقد صبغتها تبقى محتفظة بالصبغة الأولى وهذه هي الجراثيم موجبة الكرام ( G + ) أما الجراثيم التي فقدت صبغتها الأولى فإنها سوف تتلون بالصبغة المغايرة وهذه هي الجراثيم سالبة الكرام ( G - ).

## ♣ خطوات التصبيغ بصبغة كرام :

حضر الشريحة وثبتها بطريقة التثبيت التي ذكرت سابقاً.

- إضافة البنفسج البلوري crystal violet أو Gentian violet لمدة ٣٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- إضافة الايودين Gram's Iodine لمدة ٣٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- إزالة اللون باستعمال الكحول الاثيلي ethanol بتركيز ٩٥ % لمدة ١٠ – ٢٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- إضافة الصبغة المغايرة safranin لمدة ٣٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- جفف الشريحة ثم افحصها تحت العدسة الزيتية.

**ب- الصبغة المقاومة (الصامدة) للحامض Acid-Fast stain (طريقة زيل نيلسن)(Ziel-Neelsen method) :**

الكواشف:

**١- صبغة الكاربول فوكسين Carbol Fuchsin Stain بتركيز (٠.٣ %).**

**٢- محلول الكحول الحامضي Acid Alcohol Solution بتركيز (٣% ).**

- حامض الهيدروكلوريك المركز ٣ مل.
- كحول اثيلي (٩٥%) ٩٧ مل.

**٣- الصبغة المغايرة ( المثيلين الازرق Methylene blue) بتركيز (٠.٣%).**

♣ **طريقة التصبيغ Staining method :**

**١- يتم عمل المسحة على شريحة زجاجية وتثبيتها.**

---

**٢- غط الشريحة بصبغة الكاربول فوكسين مع التسخين لمدة ٥ دقائق، حتى يتصاعد البخار،( يجب ملاحظة عدم جفاف الشريحة).**

---

**٣- اغسل الشريحة بالماء.**

---

**٤- اقصر باستخدام الكحول الحامضي فترة وجيزة ( ١٥ — ٢٠ ثانية).**

٥- اغسل الشريحة بالماء.

٦- وضع الصبغة المغايرة ( المثيلين الازرق)، لمدة دقيقة واحدة

٧- اغسل الشريحة بالماء + تجفيف.

٨- افحص باستخدام المجهر الضوئي / العدسة الزيتية.

## 3- صبغة التراكيب Structural stain :

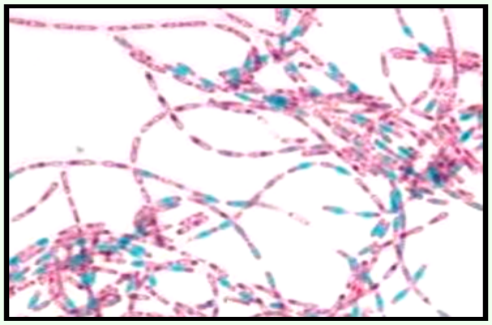
تستعمل هذه الصبغات لصبغ تراكيب الخلية الجرثومية وأهمها :

**١. صبغة الابواغ Spore stain**

إن بعض الجراثيم التابعة لجنس العصيات *Bacillus* والمطثيات *Clostridium* تنتج تراكيب مقاومة للحرارة تدعى ابواغ داخلية endospores بالإضافة إلى كون هذه التراكيب مقاومة للحرارة فإنها تقاوم بعض المواد الكيمياوية التي لها خاصية لتحطيم الابواغ. إن هذه التراكيب لا يمكن صبغها بواسطة صبغة كرام أو الصبغات الاعتيادية وتستخدم في صبغها الحرارة ( التسخين ) التي تعمل على سرعة اختراق الصبغة لجدار البوغ وتسهل عملية التصبيغ .

### خطوات صبغة الابواغ :

- حضر مسحة من جراثيم العصيات أو المطثيات ثم ثبتها بواسطة الحرارة.
- ضع محلول ٥ % من صبغة الملاكايت الخضراء ثم قم بتسخين الشريحة إلى حد التبخير لمدة ٥ دقائق.
- **اغسل بالماء.**
- أضف الصبغة المغايرة السفرانين safranin لمدة ٢٠ ثانية.
- **اغسل بالماء.**
- جفف الشريحة وافحصها باستخدام العدسة الزيتية oil immersion lens.



## ٢. صبغة المحفظـة Capsule stain

- تحاط بعض الجراثيم بطبقة من مواد جيلاتينية أو هلامية تدعى بالمحفظة capsule والتي تعتبر أحد الوسائل الدفاعية التي تستخدمها الجراثيم.

- إن المحفظة تتكون من البروتين السكري glycoprotein والبعض الأخر تتكون من متعدد البيبتيدات polypeptides وهذه المواد بطبيعتها هي مواد ذائبة في الماء water – soluble.

- لا يمكن تصبيغ الجراثيم الحاوية على المحفظة capsule بالطرق الاعتيادية والمشكلة تكمن في عملية تثبيت المسحة الجرثومية bacterial smear حيث أن الحرارة المستعملة في التثبيت تعمل على تحطيم المحفظة capsule ولذلك تستعمل صبغة تربط بين التصبيغ السالب والتصبيغ البسيط ( استعمال صبغات سالبة وهي صبغة النكروسين Nigrosin وصبغة الحبر الهندي India ink ).

- تعتبر صبغة النكروسين وصبغة الحبر الهندي من الصبغات الحامضية وذلك لاحتوائها على الأيون السالب الصابغ.

- عندما تصبغ الجراثيم ذات الشحنة السالبة بصبغة حامضية سالبة الشحنة أيضاً سوف لن تتحد الصبغة مع الشحنات السالبة الموجودة على الجراثيم.

- وبعكسه فأنها سوف تتكدس حول الخلية الجرثومية مما يؤدي إلى اصطباغ المحفظة فقط لعدم مقدرة الصبغة على اختراق الخلية الجرثومية.

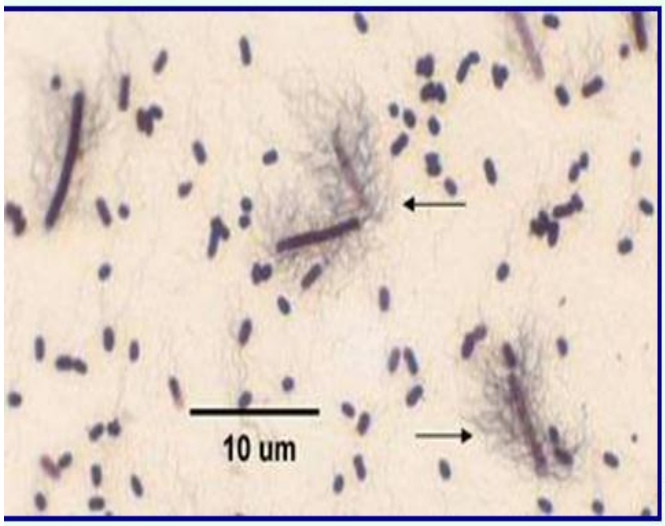
- هذا النوع من التصبغ يسمى بالتصبيغ السالب negative staining كما هو الحال في صبغ جرثومة *Klebsiella*.

## خطوات التصبيغ :

- امزج قطرة من المعلق الجرثومي مع قطرة من الصبغة Indian ink أو النكروسين Nigrosin على الشريحة الزجاجية.
- إسحب بواسطة شريحة زجاجية ثانية كما يحدث عند تحضير مسحة الدم blood smear.
- جفف الشريحة ثم افحص تحت العدسة الزيتية .

ملاحظـة : عند عمل المسحة يجب أن تكون رقيقة لان المسحات السميكة تحجب الضوء، أي عدم وضع كمية كبيرة من صبغة النكروسين أو الحبر الهندي .

## ٣. صبغة الاسواط Flagellar stain




الصبغة المستعملة تتكون مما يلي :

- كلوريد الصوديوم NaCl 1%
- حامض التانيك tannic acid 3%
- الفوكسين القاعدي basic fuchsin % 1.25 مذاب في كحول أثيلي ٩٥ %.

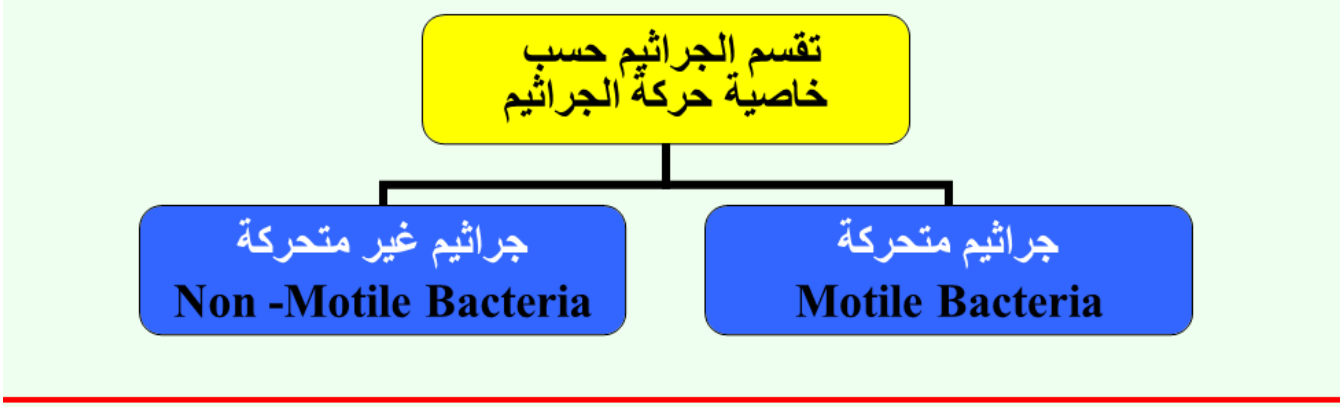
**عند تحضير الشريحة وصبغها يجب مراعاة ما يلي :**

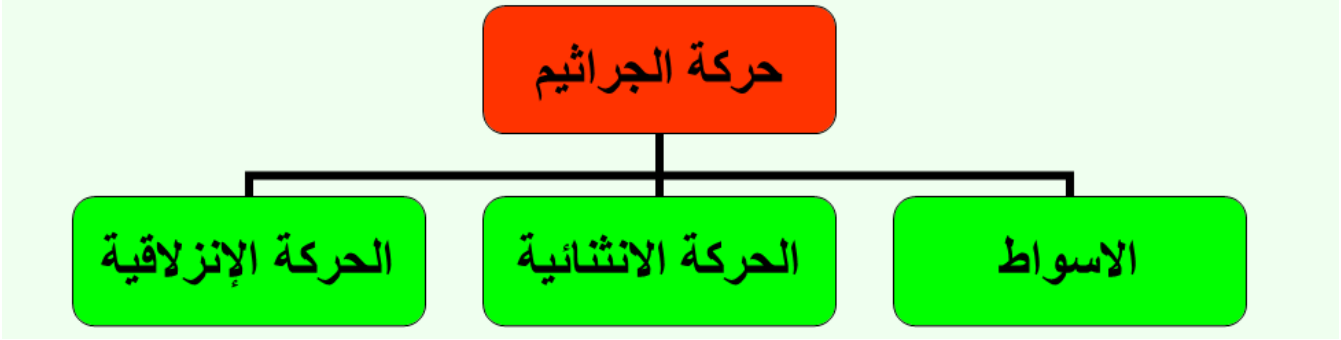
- أن تكون المزرعة الجرثومية فتية.
- يجب تحضير المسحة بعناية ، ويفضل أن يكون المستحضر الذي يحتوي على الجراثيم غير مركز.
- عند وضع معلق الجراثيم على الشريحة يفضل عدم نشرها بالناقلة بل تركها تنسكب قليلاً ثم تجفف بالهواء ولا تستعمل الحرارة لكي لا تتقلص الاسواط أو تتحطم.
- إن جسم الجرثومة سوف لن يصبغ ولذلك يفضل استعمال صبغة مغايرة بسيطة مثل المثلين الزرقاء ، حيث ينصبغ جسم الجرثومة باللون الأزرق أما الاسواط فتصبغ باللون الأحمر.

**جدول يوضح المكونات الاساسية للصبغات المختلفة :**

| Stain Type | Simple Stain | Negative Stain | Gram Stain | Acid-Fast Stain | Capsule Stain | Spore Stain |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Primary Dye الصبغة الأولية | Methylene Blue, Crystal violet or Safranin | Nigrosin | Crystal Violet | Carbolfuschin | India Ink | Malachite Green |
| Mordant المثبت | None | None | Gram's Iodine | Heat | None | None |
| Decolorizer القصر (ازالة اللون) | None | None | Acetone Alcohol | Acid Alcohol | None | None |
| Counter stain الصبغة المغايرة | None | None | Safranin | Loeffler's Methylene Blue | Crystal Violet | Safranin |

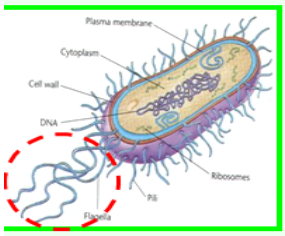
## الحركة الجرثومية Bacterial motility :



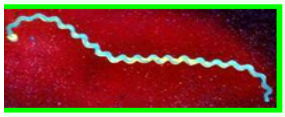




لتشخيص أي نوع من الجراثيم من الضروري عادة تحديد فيما إذا كانت الجرثومة متحركة أو غير متحركة.

وتعزى حركة الجراثيم المتحركة الى :




١. امتلاكها لعضيات خاصة تدعى الاسواط Flagella.



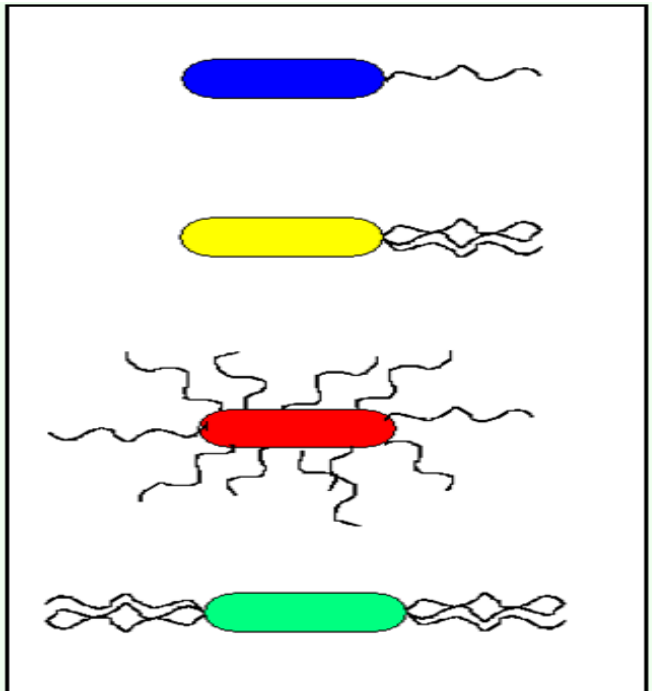
٢. الحركة الانثنائية.

٣. الحركة الإنزلاقية Gliding motility.

## 1- الاسواط Flagella :

- الاسواط هي زوائد شعرية دقيقة حرة من إحدى نهايتها وتلتصق من النهاية الأخرى بجسم الخلية.
- يبلغ طولها ٥ – ١٥ mμ أما قطرها فلا يزيد عن ١٠ – ٢٠ nm.
- لا يمكن مشاهدتها بالمجاهر الاعتيادية ولكن يمكن أثبات وجودها بواسطة حركتها الموجبة في الحقل المظلم أو باستعمال صبغات خاصة تتكدس على الاسواط بحيث تزيد من سمكها وبذلك تصبح ضمن مديات قوة إيضاح المجهر الضوئي الاعتيادي .

✓ **ترتيب الاسواط :**




## 2- الحركة الانثنائية :

- أما الحركة الانثنائية فتلاحظ عادة في الجراثيم التي لا تمتلك الاسواط مثل الحلزونيات Spirochetes.
- والحركة تتم بانثناء جسم الجرثومة على نفسها أي تقلص جانبي ومن ثم انبساط منتجة بذلك حركة انتقالية وهذه ممكن معاينتها بتأني باستعمال مجهر الحقل المظلم.

### 3- الحركة الانزلاقية Gliding motility :

- الحركة الإنزلاقية gliding motility فتلاحظ في بعض أنماط الجراثيم المخاطية slime bacteria التي لا تمتلك اسواط ولكنها تتحرك بعملية الانزلاق على سطح الوسط الصلب.

☺ **ملاحظة :** في الجراثيم غير المتحركة ، فيلاحظ عند فحصها بطريقة التحضيرات الرطبة ما يوحي بأنها متحركة وهذا يعزى إلى **الحركة البراونية Brownian movement** وهي حركة اهتزازية غير انتقالية ناتجة من تصادم أو ارتطام الجزيئات الموجودة في السائل .

### ♣ طرق فحص الحركة الجرثومية :

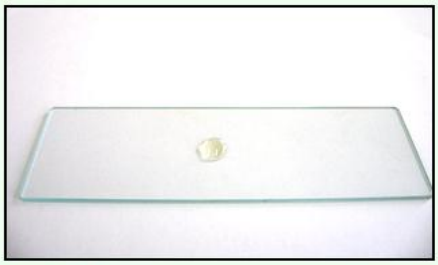
١. طريقة المستحضر الرطب **Wet mount slide**

٢. طريقة المزج مع الزيـــت **Mixing with the oil**

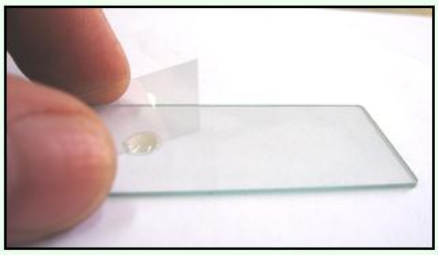
٣. طريقة القطرة المعلقة **Hanging drop slide**

٤. فحص الحركة بطريقة طعن الوسط شبه الصلب
**Semisolid stabbing method**

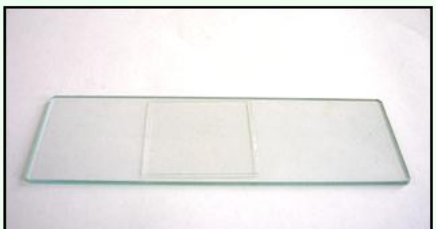
## 1- طريقة المستحضر الرطب Wet mount slide :



١. تعد هذه أسهل طريقة لفحص الحركة عندما يتم التعامل مع جراثيم غير مرضية non-pathogenic bacteria.



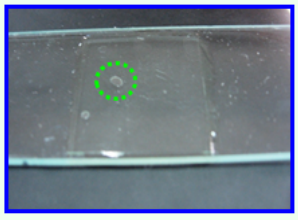
٢. يتم وضع نقلة حلقية من معلق الجراثيم على شريحة زجاجية نظيفة ثم تغطى بغطاء الشريحة cover slide.



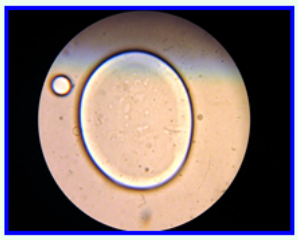
٣. وتفحص باستعمال العدسة الزيتية، ومن عيوب هذه الطريقة أنها تجف بسرعة ويجب استكمال الفحص بعد التحضير مباشرة.

## 2- طريقة المزج مع الزيت Mixing with the oil :

- توضع قطرة من الزيت في منتصف الشريحة الزجاجية ثم تنشر إلى مساحة ١ سم ٢.



- تؤخذ نقلة حلقية من معلق الجراثيم وتمزج مع الزيت.



- يوضع فوق المزيج غطاء الشريحة ويضغط بهدوء ، سوف يؤدي الضغط إلى اصطياد فقاعات مائية بين الزيت تحتوي على الجراثيم المتحركة.

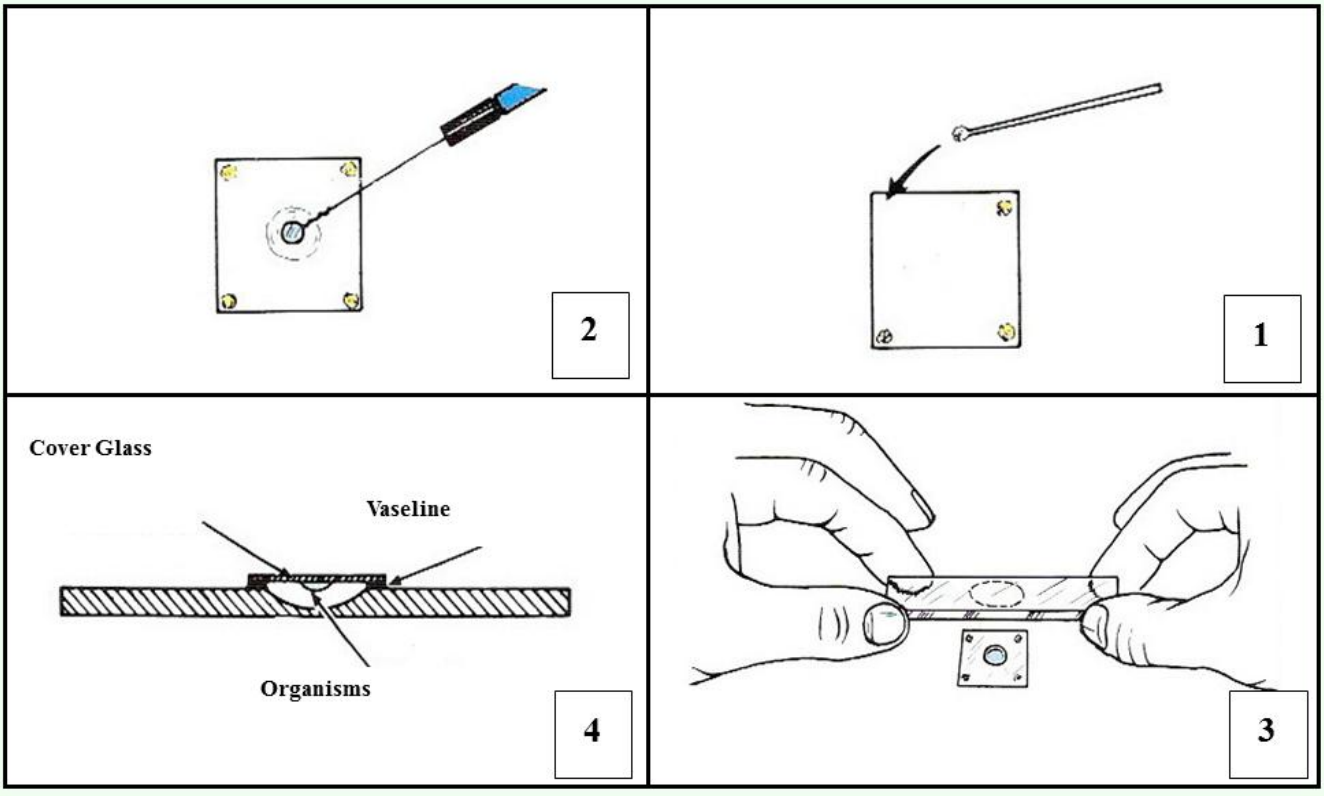
- افحص بالعدسة الزيتية بعد المعاينة بالعدسة الشيئية ( ممكن أن تبقى هذه التحضيرات عدة ساعات من دون أن تجف ).

## 3- طريقة القطرة المعلقة Hanging drop method :

تجرى هذه التقنية بواسطة الشريحة الزجاجية المقعرة.

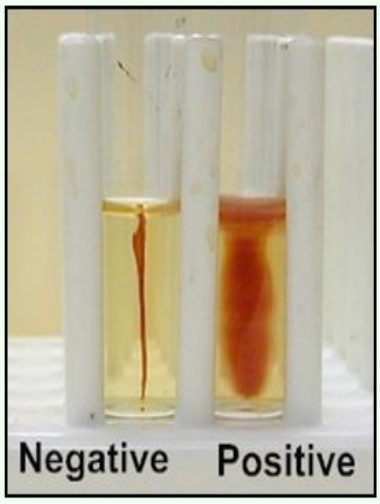
- يوضع الفازلين Vaseline أو دهن السليكا على شكل نقاط في الزوايا الأربعة لغطاء الشريحة أو على شكل حلقة حول التقعير الموجودة على الشريحة الزجاجية.
- ضع نقلة حلقية من الزرع الفتي young growth المراد فحصه في منتصف غطاء الشريحة الزجاجية cover slip.
- ارفع الشريحة الزجاجية واقلبها فوق الغطاء الزجاجي والصقها بهدوء واضعاً القطرة في منتصف الحلقة ، ثم أقلبها بهدوء وافحص بالعدسة الزيتية.

☺ ملاحظــة : الشريحة المحضرة جيداً تبقى لساعات من دون أن تجف لأن الحلقة المعمولة من الفازلين تمنع الجفاف.



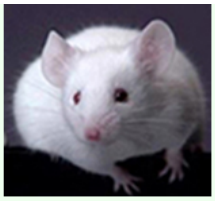
- عند التعامل مع جراثيم ممرضة pathogenic bacteria مثل جراثيم التايفوئيد فمن الخطورة محاولة تحديد الحركة بطريقة الشريحة الزجاجية.

- لذلك يتم فحص الجراثيم بطريقة الطعن باستعمال إبرة الزرع في أنابيب حاوية على وسط شبه صلب semi solid medium مثل وسط الجلاتين بنسبة ١٢ – ١٥ % أو الاكار بنسبة ٠.٥ – ١ %.




- فالجراثيم المتحركة سوف تنتقل إلى محيط الطعنة منتجة عكارة أو في بعض الأحيان تتحرك إلى مسافات قريبة من منطقة الطعن ، أما الجراثيم لغير متحركة فينحصر نموها في منطقة الطعنة stab region.

## ♣ التعداد الجرثومي Bacterial count:



يعتبر عد الجراثيم من المتطلبات المهمة في دراسة وتنمية الجراثيم مثل :

- حالات الخمج التجريبي experimental infection.
- حالات التسمم الغذائي food poisoning.
- تحضير اللقاحات vaccine preparation.

يمكن حساب أعداد الجراثيم كما يلي :

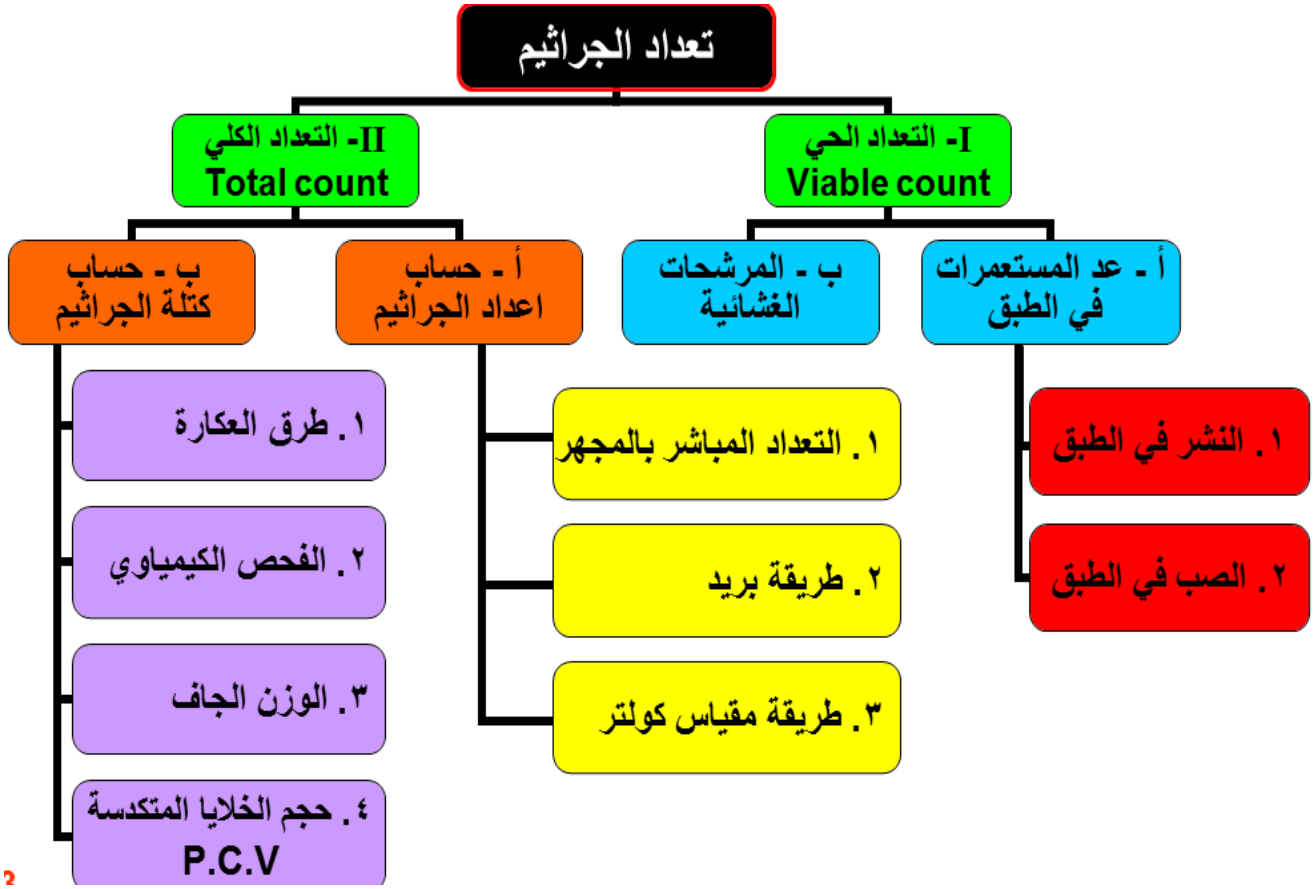
١. **حساب أعداد الجراثيم Bacterial count** : وهذه تستعمل مع الخلايا الأحادية التي يسهل تعدادها مثل الجراثيم والخمائر.

٢. **حساب كتلة الخلايا Cells mass** : وهذه تستعمل في الحالات التي تكون فيها الجراثيم متكدسة أو متجمعة على بعضها ويصعب جعلها خلايا منفردة ، وكذلك إن كانت خيطية filamentous مثل الفطريات.

**يمكن تقسم التعداد الجرثومي إلى قسمين :**

١. **التعداد الحي Viable count: يتم عد الجراثيم الحية فقط.**

٢. **التعداد الكلي Total count: يتم عد الجراثيم الحية والميتة.**



## 1- التعداد الحي Viable count:

- من المعروف أن خلية جرثومية واحدة تؤدي إلى تكوين مستعمرة مرئية وعليه فإن عدد المستعمرات النامية على وسط الاكار تماثل العدد الأصلي للجراثيم.

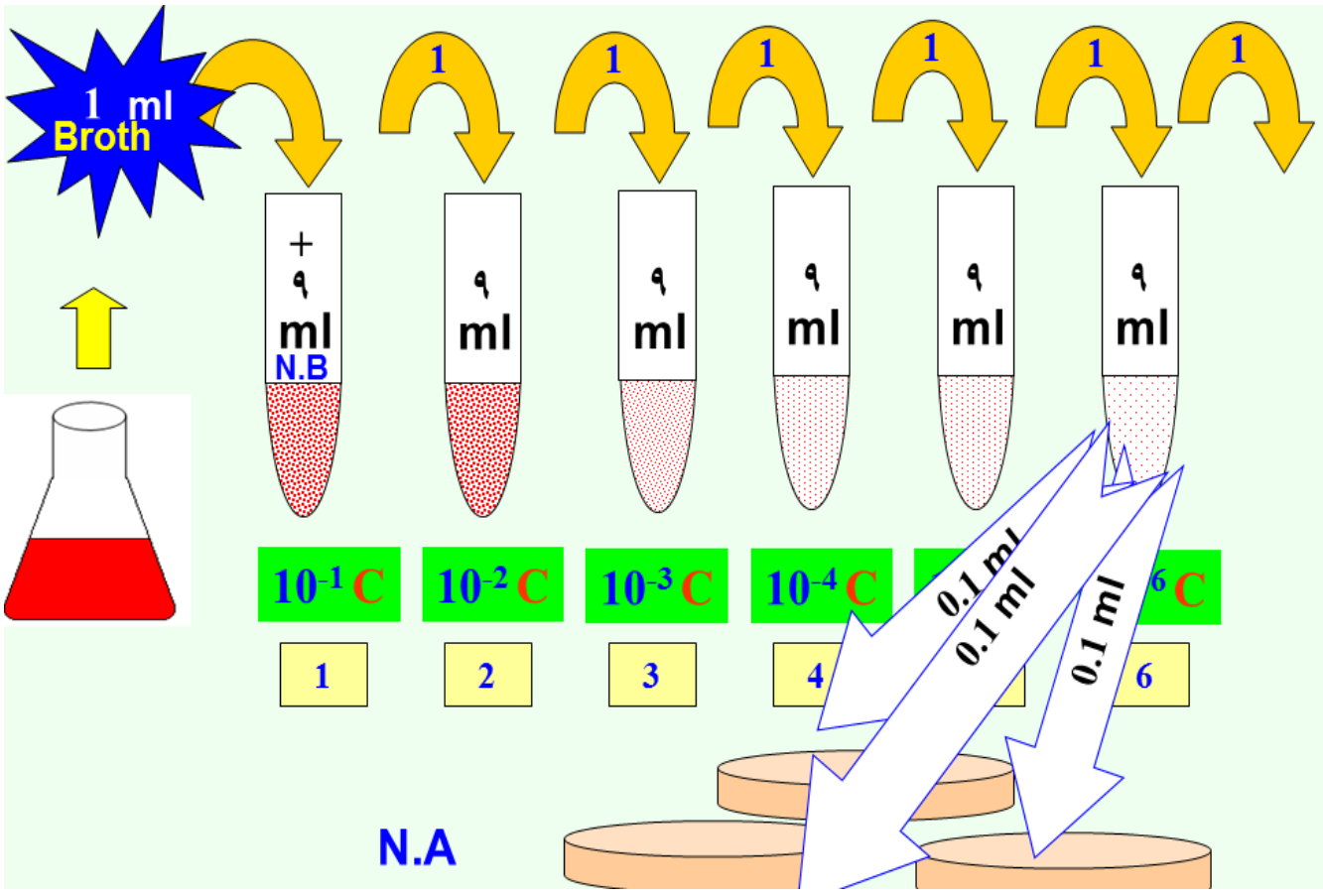
يمكن عد الجراثيم الحية بالطرق التالية :

أ- عد المستعمرات في الطبق : وتجرى هذه بطريقتين :

١- النشر في الطبق Spreading plate method

٢- الصب في الطبق Pour plate method

تتم كلا الطريقتين عادة بإجراء تخافيف عشارية أو مضاعفة من العينة في أنابيب اختبار تحتوي على سائل زرعي معقم أو سائل ملحي معقم ثم تؤخذ عينات بمقدار 0.1 مل وتزرع بإحدى الطريقتين ،حيث يتم زرع ثلاثة أطباق من كل تخفيف ( التخفيف الأفضل ).



## 1- طريقة النشر في الطبق :

- توضع كمية 0.1 مل من المحلول المخفف الذي يحتوي على الجراثيم فوق الوسط .
- ثم تنشر بواسطة الناشرة الزجاجية glass spreader ( لا تستعمل المسحات القطنية لأنها تمتص قسم من العالق الجرثومي ).

- يترك الوسط لمدة 5 دقائق لكي يتم امتصاص العالق.
- توضع الاطباق في الحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 16 - 24ساعة.
- يتم بعدها عد جميع المستعمرات النامية في الطبق ومن ثم يحسب عدد الجراثيم كما يلي :
- **العدد الجرثومي في العينة الأصلية = العدد الكلي للمستعمرات في الطبق × 10 × مقلوب التخفيف**



**= ٥٠ × 10 × 10 $^{6}$**

**= 500 × 10 $^{6}$**

**خطوات عمل طريقة النشر في الطبق :**

1- وضع كمية 0.1 مل من المعلق الجرثومي المخفف .

2- غمر الناشر الزجاجي بالكحول .

3- تلهيب الناشر الزجاجي بواسطة اللهب .

4- نشر المعلق الجرثومي على جميع الطبق .

5- تترك الاطباق لفترة وجيزة ثم توضع في الحاضنة بدرجة 37م° ولمدة تتراوح بين 16-24 ساعة.

6- يتم بعدها عد المستعمرات النامية في الطبق .

7- العد الجرثومي في العينة الاصلية = العدد الكلي للمستعمرات X10 X مقلوب التخفيف .

## 2- طريقة الصب في الطبق :

### خطوات العمل :

1- يتم اولا تخفيف العينة المراد معرفة التعداد الجرثومي لها .

2- توضع النقلة الجرثومية (0.1) مل من العالق الجرثومي في طبق بتري .

3- يضاف اليه Nutrient agar المنصهر في درجة 45م° ويتم تحريك الطبق حركة دائرية عدة مرات باتجاه عقرب الساعة وعكس اتجاه عقرب الساعة لتجانس التوزيع .

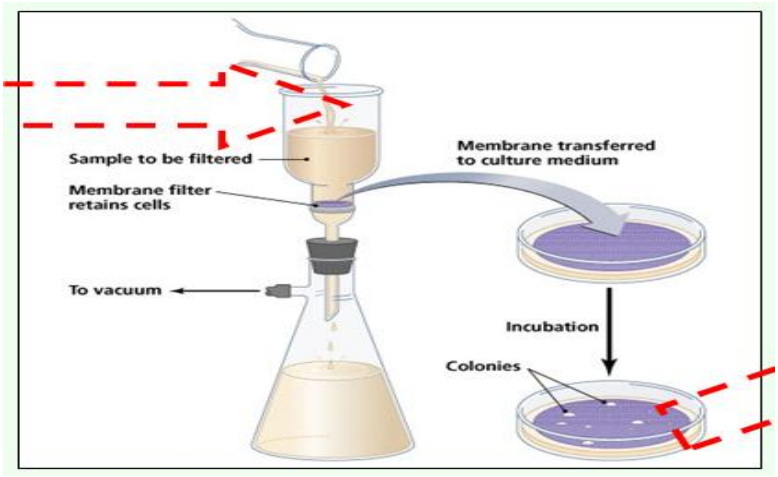
4- يترك الاكار ليتصلب ثم توضع الاطباق في الحاضنة بدرجة 37م° ولمدة تتراوح بين 16-24 ساعة.

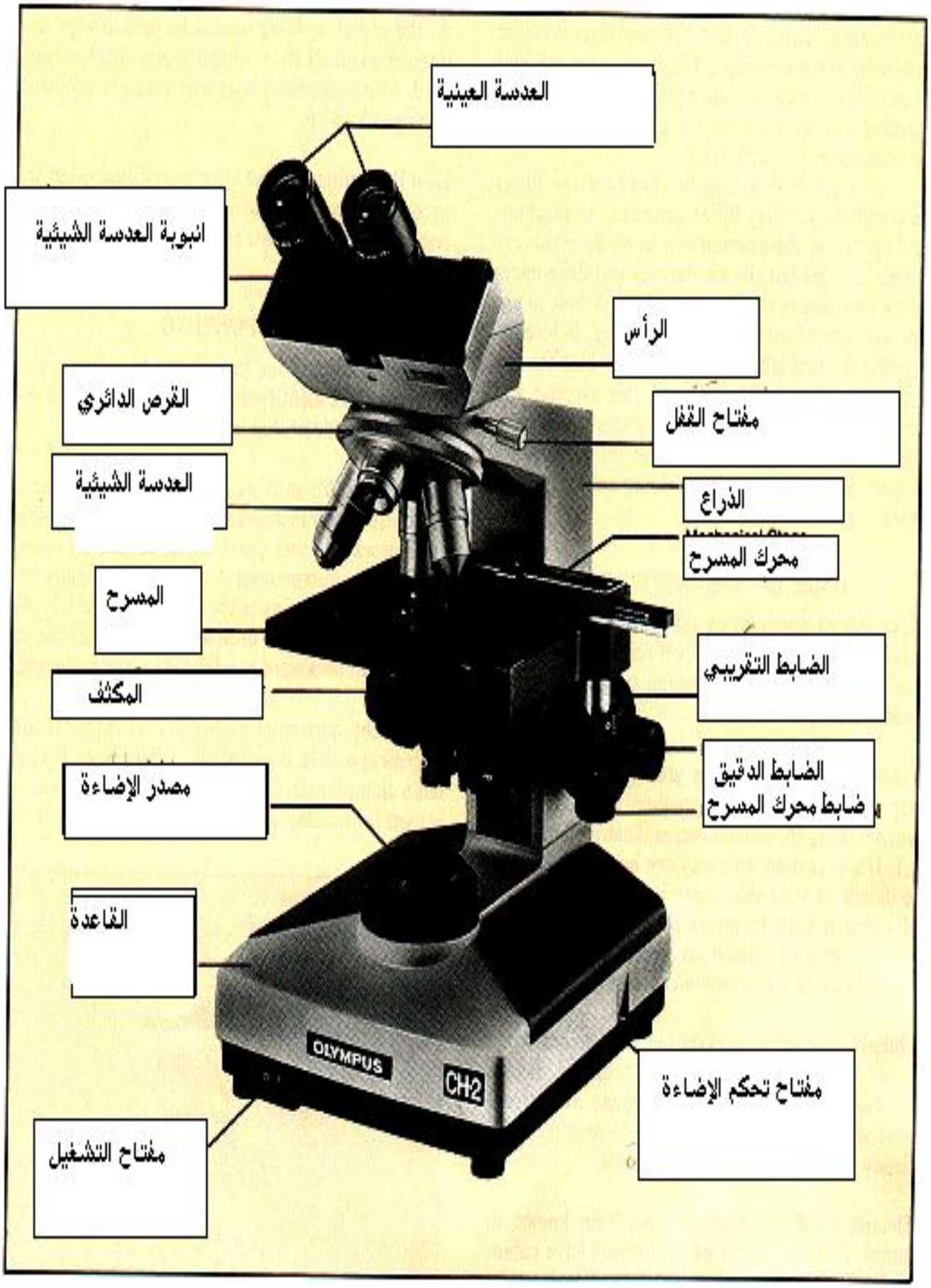
5- يتم بعدها عد جميع المستعمرات النامية على الطبق .

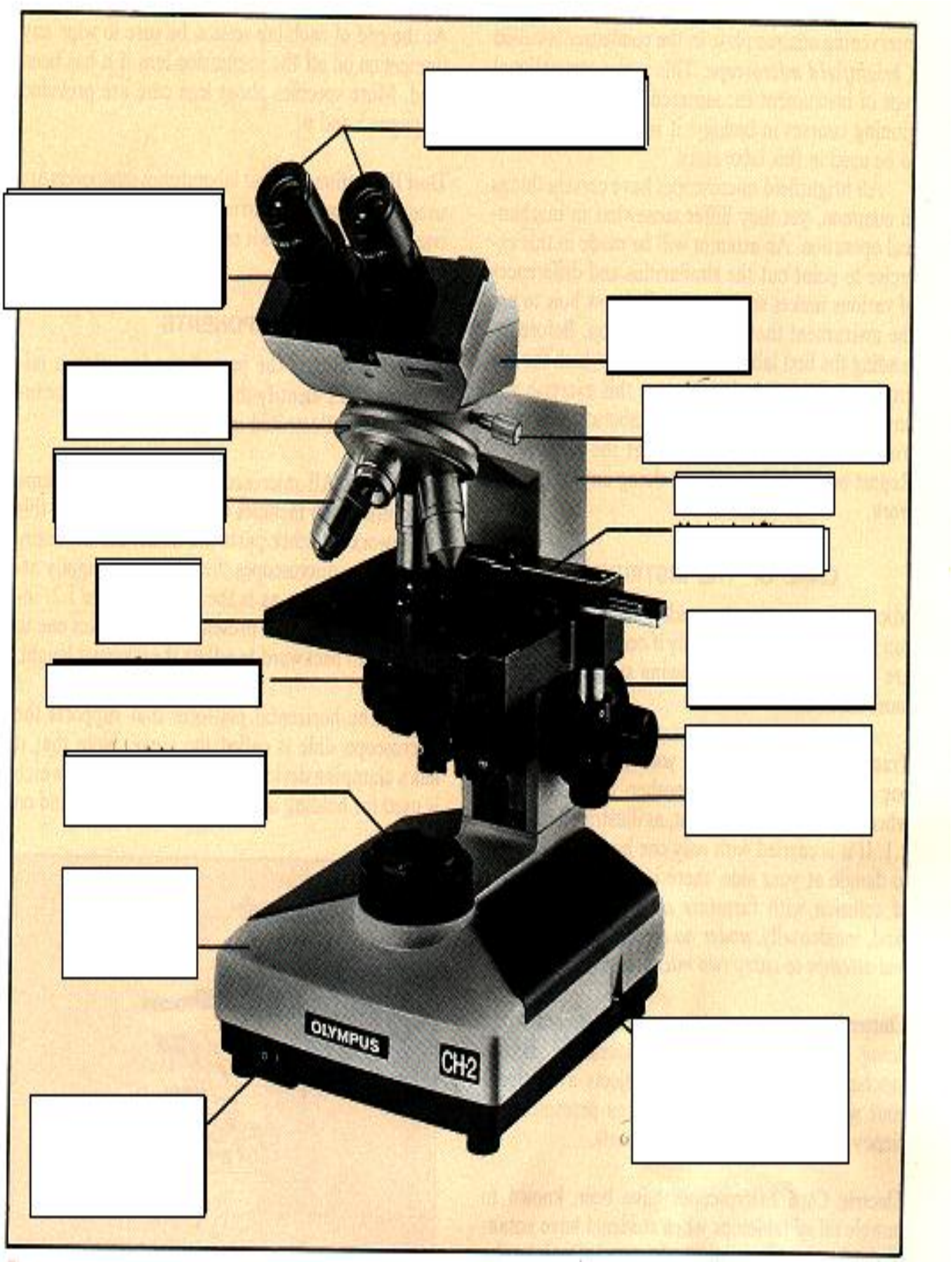
6- العد الجرثومي في العينة الاصلية = العدد الكلي للمستعمرات X10 X مقلوب التخفيف .

## ب- طريقة المرشحات الغشائية Membrane filter method :

- يمكن قياس أعداد الجراثيم الحية بتمرير العينة من خلال المرشحات الغشائية التي تحجب أو تعيق مرور الجراثيم.
- بذلك سوف تبقى الخلايا الجرثومية فوق السطح الغشائي ثم بعد ذلك يؤخذ السطح الغشائي ويوضع فوق سطح الاكار المناسب للنمو.
- حيث يمتص غشاء المرشحة المواد الغذائية من الوسط وهذا يؤدي إلى نمو الجراثيم إلى مستعمرات مرئية فوق سطح الغشاء.




العدسة العينية
انبوبة العدسة الشيئية
الرأس
القرص الدائري
مفتاح القفل
العدسة الشيئية
الذراع
محرك المسرح
المسرح
الضابط التقريبي
المكثف
الضابط الدقيق
ضابط محرك المسرح
مصدر الإضاءة
القاعدة
OLYMPUS
CH2
مفتاح تحكم الإضاءة
مفتاح التشغيل


OLYMPUS
CH2