

الجلسة العملية الأولى

2020 أحياء دقيقة

القائمة بالأعمال :لانا الجمعات

موضوع الجلسة

- ✓ مقدمة عامة
- ✓ السلوك و الاحتياطات للعمل في مخبر الأحياء الدقيقة
- ✓ الأدوات المستخدمة في مخبر الأحياء الدقيقة
- ✓ أنواع المجاهر
- ✓ استخدام المجهر الضوئي
- ✓ طرق تلوين للجراثيم

► يضم علم الأحياء الدقيقة الجراثيم و الطفيليات (الاولي و الديدان و الحشرات) و الفطور و الفيروسات .

الأدوات و الأجهزة في مخبر الأحياء الدقيقة :

1- أطباق البتري petri dish

مجموعة علب مستديرة زجاجية أو لدائنية جاهزة ذات غطاء غير محكم يصب فيه الغراء المطلوب و تمكننا من دراسة الخصائص الشكلية للمستعمرات الجرثومية النامية .

لعلب البتري أقطار مختلفة حسب الطلب : 6 ، 8-10-15 سم



-2- الغانة أو عروة البلاتين : Platinum loop

سلك معدني من خليطة النيكل و الكروم سريع الاحمرار و سريع التبريد يستخدم لأخذ عينات الزرع و ممكن استخدامها لفرش العينة المأخوذة على الأوساط الصلبة (التثليم) . من الغانات ما هو بشكل عروة و هو أشهرها و منها ما هو بشكل مستقيم و منها ما هو بشكل مجرفة .



3-الملهب flamm :

أي مصدر صغير للهب كمصباح البنزن يستخدم لتلهب الغانة حتى احمرارها قبل لمسها بأية عينة للزرع و كذلك لتلهب فوهات أنابيب الزرع و رؤوس الملاقط و تلهب سطوح الآغار قبل تخثره و بعد صبه في أطباق البتري .



4- أنابيب زجاجية قابلة للتعقيم بالمحم .

5- حوامل للأنابيب .

6- سواتر زجاجية و صفائح زجاجية .



7- المعقمة sterilizer

أو الفرن الجاف تصل حرارته إلى 250 درجة مئوية يستخدم للتعقيم بالحرارة الجافة .

7

8-الحاضنة incubator :

صندوق معدني معزول له باب واسع يعطينا الحرارة المطلوبة لحضن أوساط الزرع جرثومي 35 درجة – فطريات 25 درجة



9-الصاد الموصل أو الأوتوفلاف Autoclave :

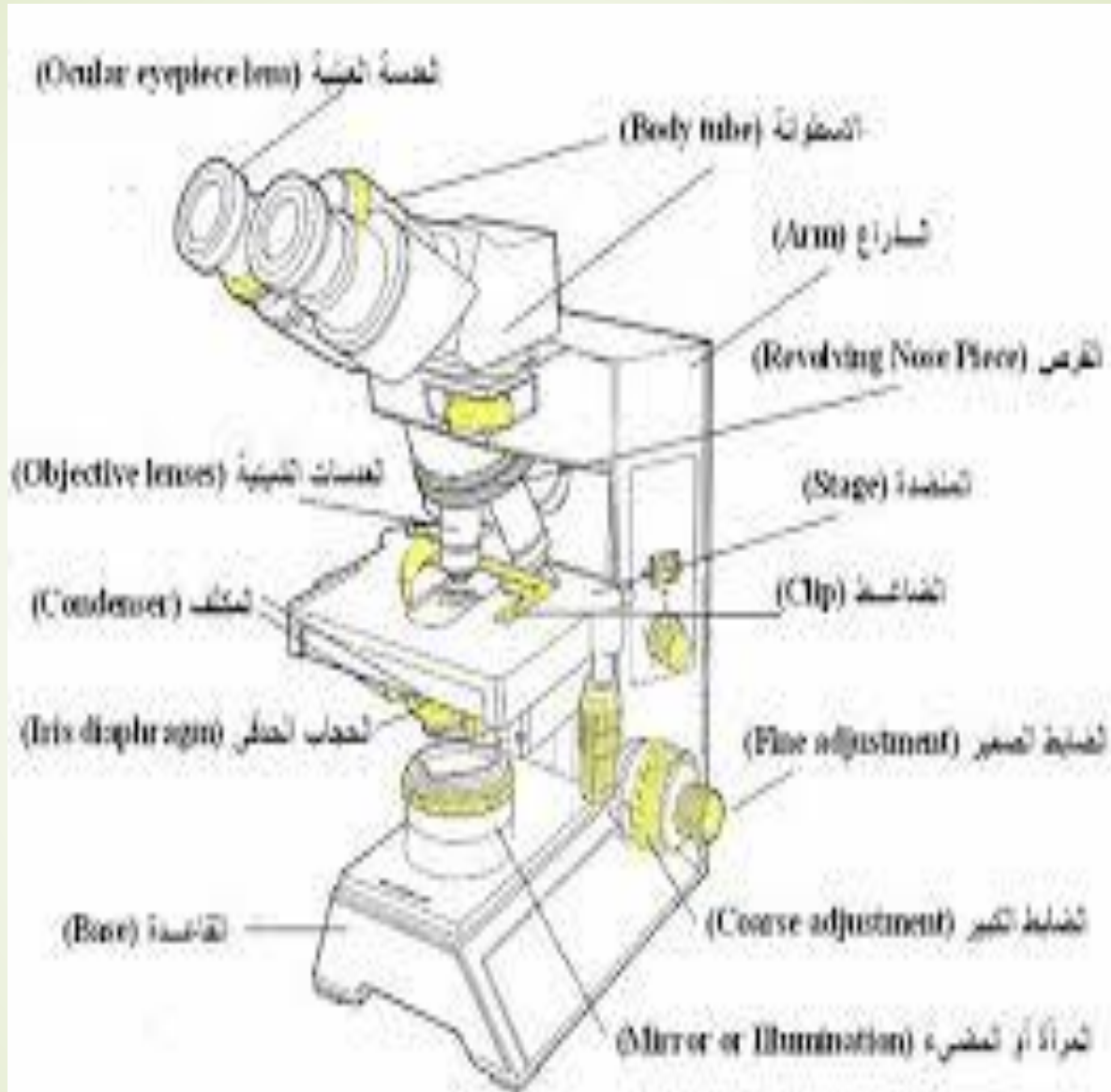
قدر معدني في أسفله حامل معدني و يضاف الماء حتى السوية العليا للحامل يشبه عمله طنجرة الضغط له غطاء محكم مجهز بميزان للضغط و ميزان حرارة مع صمامين أمان .
يستخدم للتعقيم الرطب و أيضاً لإتلاف العينات الملوثة .



9- المجهر الضوئي

يعد اختراع المجهر عام 1674م على يد الهولندي لوفنهوك Anton van Leeuwenhoek البداية الحقيقية لعلم الأحياء الدقيقة Microbiology .
يتم استخدام أنواع متعددة من المجاهر في دراسة الأحياء الدقيقة مثل المجهر الضوئي ,
المجهر ذو الساحة المظلمة , المجهر متباين الأطوار المجهر الالكتروني .





استخدام المجهر الضوئي

التكبير لرؤية الأجسام التي لا ترى بالعين المجردة .

أجزاء المجهر :

1- جملة الهيكل : تتألف من قاعدة المجهر مع العماد و قرص دوار يحمل العدسات الجسمية , ورف المجهر (هو حامل الشريحة) و الملقط , و دراجة المجهر تحرك الشريحة بالاتجاهات الأربعة .

2-جملة التكبير و تشمل :

- العدسات العينية القريبة من عين الفاحص تكبير كل منها 10 أو 15 أكرس .
- تتحرك العينيتان في المجهر الضوئي على مسطرة مدرجة اقتربا و ابتعادا و هذا ما يسمى المسافة بين العينيتين و هي قدر ثابت لكل فاحص يتيح له مشاهدة خيال واحد عند النظر الى المحضر عبر العينتين معاً

- العدسات الجسمية و هي مثبتة على القرص الدوار تكبيرها :

4أكس , 10 أكس , 40 أكس , 100 أكس (الغاطسة) تصغر فتحتها كلما كبر تكبيرها لكل منها رقم
و خط ملون يميزها , أقصرها 4 أكس و أطولها 100 اكس .

قوة التكبير هي حاصل ضرب تكبير العدسة العينية بتكبير العدسة الجسمية .



3-جملة الاضاءة : تتكون من منبع ضوئي كهربائي عادة يتجه من أسفل الى اعلى باتجاه العينات مرورا بالمكثفة الضوئية (تحت الرف) التي تجمع الاشعة الضوئية بحيث يقع محرقها (بؤرتها) على شئ المفحوص (الشريحة) . ضمن الجملة يوجد الحجاب (الحظار) ووظيفته التحكم بكمية الضياء الصادرة من المنبع الضوئي باتجاه الشريحة المفحوصة زيادة او نقصانا يوجد أسفل المكثفة مرشحة زرقاء اللون لاستعمال ضوء وحيد بسيط لزيادة جودة الرؤية .

4-جملة الاحكام :

- لولبا الاحكام السريع لرفع و خفض رف المجهر .

- لولبا الاحكام البطئ (الدقيق) للمطابقة الدقيقة.

لا تستخدم لولبي الاحكام البطيء لرفع و خفض رف المجهر مسافات كبيرة وذلك بإدارته عدد كبير من الدورات لان ذلك يؤدي الى كسر مسننات اللولب , يستخدم فقط بمقدار دورة او اقل للأمام او الخلف فقط .

- 5- لولب المكثفة لرفع و خفض المكثفة .
- 6- ذراع التحكم بقطر فتحة الحجاب .
- 7- لولبا الدراجة (يمين يسار – امام خلف) لتحريك المحضر الموضوع على رف المجهر .

المباعدة (استخراج الساحة المجهرية)

❖ الفحص بالعدسة 10 اكس المكثفة أسفل ما يمكن .

يجب رفع رف المجهر الحامل للمحضر المطلوب فحصه الى اقرب ما يمكن من العدسة الجسمية 10 اكس و عين الفاحص تنظر الى الشريحة مباشرة , ثم يضع الفاحص عينيه على العينتين و يبدأ بابعاد المحضر عن الجسمية بلولب الاحكام السريع رويدا رويدا حتى ظهور الساحة المجهرية و من ثم تضبط بلولب الاحكام الدقيق ثم يوضع الشئ المفحوص في مركز الساحة.

❖ الفحص بالعدسة 40 اكس المكثفة في الوسط (او اعلى قليلا)

بعد اظهار الساحة على العدسة 10 , ننزل العدسة 40 , يتحرك القرص الدوار ثم تجري المطابقة الدقيقة .

❖ الفحص بالعدسة 100 اكس المكثفة أعلى ما يمكن و الحجاب مفتوح .

توضع قطرة زيت على العدسة الغاطسة , ثم تنزل العدسة حتى تغطس برفق و تلامس سطح الشريحة المطلوب فحصها , يضع الفاحص عينيه على العينين و يبدأ بابعاد الشريحة عن الغاطسة باستعمال اللولب السريع حتى تظهر الساحة ومن ثم البطئ للمطابقة الدقيقة

صيانة المجهر

- ✓ المقصود به العناية اليومية بالمجهر قبل كل فحص و بعد الانتهاء و تتضمن إزالة زيت الأرز عن الغاطسة بالأوراق الخاصة للعدسات بعد ترطيبها بالاكزيلول .
- ✓ مسح المجهر كاملاً بالكحول عدا العدسات لتنظف بالاكزيلول كما ذكرنا
- ✓ اطفاء المجهر بعد الانتهاء من استخدامه
- ✓ تغطيته بالغطاء المخصص لتجنب الغبار و الأوساخ و ضوء الشمس المباشر على المجهر ووضعه في مكان آمن وبارد .

احذر مايلي :

- ترك زيت الأرز على العدسات أو ترك العدسة الغاطسة بوضعية العمل على المحضر فترة طويلة .
- استعمال زيت الارز بإسراف و كذلك استعمال الاكزيلول بإسراف فلا يستعمل الاكزيلول إلا لإزالة الزيت فقط (لا تستخدمه لباقي أجزاء المجهر فهو مذيّب عضوي) .
- لا تستعمل كل ما يعطي زغب من الأدوات لتنظيف عدسات المجهر .
- يحمل المجهر بحذر عندما نريد نقله : يد تحت القاعدة و يد تمسك بعماد المجهر .

الفحص المباشر للجراثيم Direct examination

1- الفحص المجهرى العييط :

نأخذ عينة من المستعمرة أو العينة المراد فحصها و نستحلبها بقطرة من الماء المقطر المعقم على صفيحة زجاجية نظيفة و معقمة ثم نغطي المحضر بساترة و نقوم بالفحص المجهرى بالعدسة الجافة X10 ثم X40 .

2- الفحص مع التلوين :

لا بد من تحضير اللطاخة بشكل نظامي :

1- الاستحلاب و الفرش و التجنيس :

الاستحلاب بقطرة ماء معقمة على صفيحة زجاجية نظيفة و معقمة ثم نفرشها 2سم بواسطة غانة معقمة و نقوم بإجراء حركات تدوير لتجنيس اللطاخة و ترقيقها و فرشها .

2- التجفيف : للتخلص من ماء اللطاخة بتركها تجف في الهواء أو إمرارها على نار لطيفة غير مؤذية .

3- التثبيت : للصلق اللطاخة على البللورة و ذلك بتخثير المواد المخاطية و البروتينية الموجودة فيها يتم ذلك بإمرار اللطاخة على النار مباشرة أسفل الصفيحة و لعدة مرات و بسرعة معتدلة .

أشكال الجراثيم

19

- المكورات Cocci: القطر 1 ميكرون ذات شكل مستدير أو بيضوي أو قد تشبه لهب الشمعة مثال المزدوجات الرئوية Pneumococci

مزدوجات

Diplococci

رباعيات

Tetrads

الإصطفاف

عناقيد

Staphylococci

عقديات

Streptococci

□ **Bacilli العصيات :** الطول 3الى 8 ميكرون , القطر 0,5 إلى 1ميكرون .

1. مستقيمة بأشكال عديدة مقطوعة الطرفين مثل عصيات الجمره الخبيثة *Bacillus anthracis*
2. و منها ما له نهاية واحدة مدببة كالوتديات *Corynebacterium*
3. أو نهايتين مؤنفتين كالعصيات المغزلية *Fusiformis*
4. و منها ماله نهاية مستديرة الطرفين مثل جراثيم عائلة الأمعائيات *Enterbacteriaceae*
5. و منها ما يأخذ شكل منحنى كالضمة *Vibro* مثل ضمة الكوليرا *v.cholerae asiaticae*

الإصطفاف : عشوائي أو منتظم قد تبقى بشكل منفرد "عصيات منفردة السلمونيا" أو مصطفة على شكل حبة القمح "عصيات وتدية"

الملتويات spirochetes و الحلزونيات Spiral:

عصيات طويلة ذات شكل حلزوني الطول 10 – 30 ميكرون القطر 0,3 – 0,5 ميكرون .

1-بورليات borrelia

يتراوح طولها بين 10-30 ميكرومتر و هي أكبر الملتويات المرضية حجما ثنيتها و الفراغات بينها غير منتظمة .

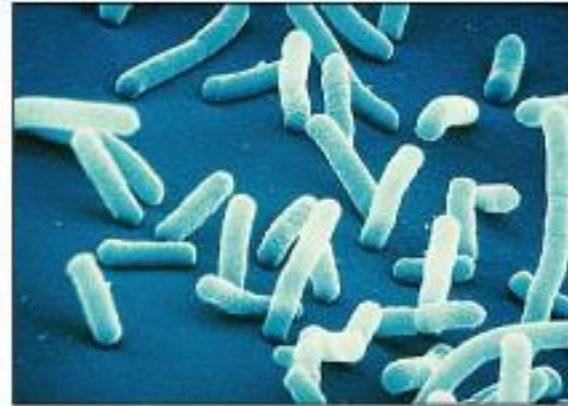
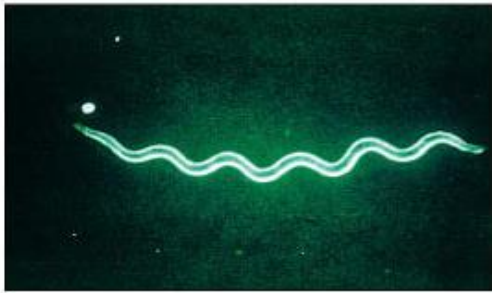
2-لولبيات treponema

يتراوح طولها بين 6-14 ميكرومتر ثنيتها منتظمة و الفراغات بينها تقدر بـ1 ميكرومتر مثل اللولبية الشاحبة T.pallidum عامل داء الإفرنجي (الزهري).

3-بريميات leptospira

من 6-20 ميكرومتر ثنيتها ضيقة و متقاربة و غزيرة .

أشكال الجراثيم



مكورات



Spheres



Single
(Coccus)



Pairs
(Diplococcus)



Tetrad



Chain
(Streptococcus)



Cluster
(Staphylococcus)

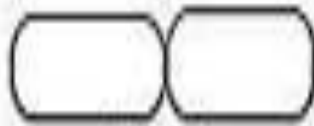
عصيات



Rods



Single
(Bacillus)



Pairs



Chain

Spiral

ملتوية





مكورة

Coccus



عُصَوْرَة

Coccobacillus



ضَمَّة

Vibrio



عُصَيَّة

Bacillus



حُلَيْزَنَة

Spirillum



مُلْتَوِيَّة

Spirochete

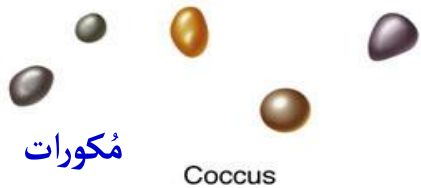
مقارنة الأبعاد

• مكورة

• عصورة

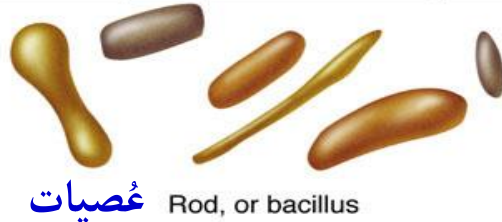
• عصىة

• ملتوية



مُكورات

Coccus



عُصيات

Rod, or bacillus



عُطيفات

Curved forms: Spirillum/Spirochete



Diplococci
(cocci in pairs)

مُكورات
مزدوجة



Neisseriae
(coffee-bean shape
in pairs)



عُصَوَّرات

Coccobacilli

ضَمَّات



Vibrios
(curved rods)

مكورات
رباعية



Tetrads
(cocci in packets of 4)

مكورات
رُزمية

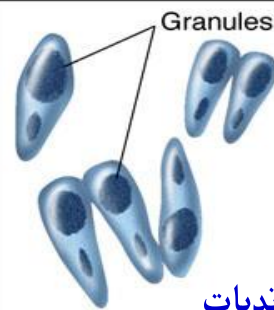


Sarcinae
(cocci in packets of
8, 16, 32 cells)



مُتفطِّرات

Mycobacteria



وتديات
Corynebacteria
(palisades arrangement)

حَلِيْزِيَّات



Spirilla

مكورات
عقدية



Streptococci
(cocci in chains)



مكورات دقيقة
وعنقودية



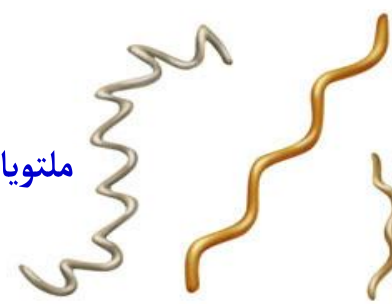
عُصيات مُبَرِّرة

Spore-forming rods



مُتسلسلات
Streptomyces
(moldlike, filamentous
bacteria)

ملتويات



Spirochetes

طرق التلوين الجرثومي

تصنف طرق التلوين إلى :

التلوين البسيط : نستعمل فيه ملوناً أحادي فقط مثل ملون زرقة الميتلين

التلوين المركب : و نستعمل فيه أكثر من ملون واحد و على عدة مراحل يتخللها مزيج لون مثالها طريقة غرام و طرق التلوين المقاوم للحمض لتسيل نلسون أو كينيون .

ملون زرقة الميتلين

له استعمالات متفرقة وهامة فهو يطبق للتعرف على عصيات الدفتريا كما أنه ملون ممتاز و سريع للتلوين البسيط بدراسة الشكل الجرثومي مع التجمعات الجرثومية إن وجدت و يمكن لهذا الملون أن يظهر الجراثيم في بعض العينات مثل مفرزات الإحليل مع أنها سلبية بطريقة غرام .

طريقة التلوين

يطبق الملون لمدة دقيقة واحدة على اللطاخة تشطف بالماء العادي ثم تستنضب.

تحضير لطاخة جرثومية من اللعاب

-تعقم ابرة البلاتين (الغانة) على اللهب بشكل عمودي حتى التوهج او الاحمرار مع تمرير الحامل على اللهب 3 مرات .

-تؤخذ العينة على حلقة ابرة البلاتين فوق المغسلة و تستحلب بقطرة ماء .

-تفرش العينة في المنتصف صفيحة زجاجية (مساحة 2 سم) و تمزج جيدا بهدف تجنيس العينة بتحريكها بالغانة .

-تعقم ابرة البلاتين مرة أخرى بنفس الطريقة السابقة قبل وضعها على الطاولة.

- تجفف اللطاخة (هواء او حرارة لطيفة) و علامة الجفاف ان يصبح مظهرها كامد (غير شفاف) .
- تثبيت اللطاخة لصق اللطاخة على الصفيحة الزجاجية بتخثير المواد البروتينية الموجودة فيها و ذلك بتمريرها على اللهب (2-3 مرات) بسرعة متوسطة و كذلك يقوم التثبيت بقتل الخلايا و الجراثيم مما يسمح بتلوينها .

ملاحظة :

لا تثبت اللطاخة قبل تمام الجفاف لان ذلك يؤدي الى تشوهها اثناء التثبيت و الى اخطاء فى التلون
تثبيت غير الكافي يؤدي الى جرف اللطاخة مع ماء الملون
التثبيت الكثير يؤدي الى حرق اللطاخة

• التلوين :

- 1-يغمر المحضر بزرقة المتيلين لمدة دقيقة واحدة .
- 2-يغسل بالماء لازالة الفائض من الملون .
- 3-يجفف بين ورقتي نشاف بالضغط الخفيف لتجنب مسح اللطاخة .

• الفحص المجهري :

- 1-تستخرج الساحة المجهرية للمحضر أولا على العدسة 10 و نختار مساحة مناسبة للفحص .
- 2-يفحص المحضر على العدسة الغاطسة 100.

ما يشاهد في محضر اللعاب أو القشع تحت المجهر

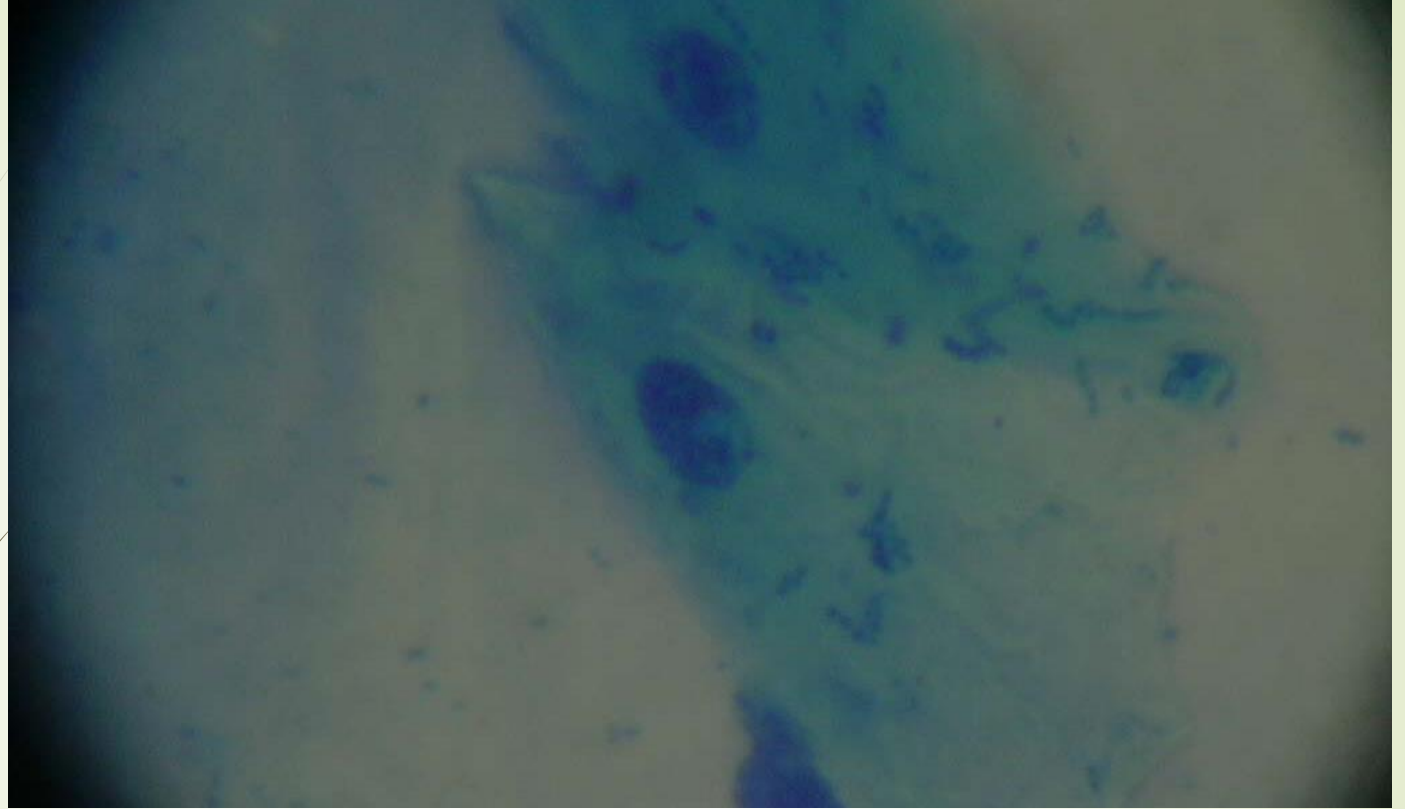
خلايا بشروية (ظهارية) مضلعة كبيرة تأخذ اللون الازرق و تكون نواتها غامقة

ألياف مخاطية (قشع) لونها أزرق تشكل خلفية الساحة المجهرية

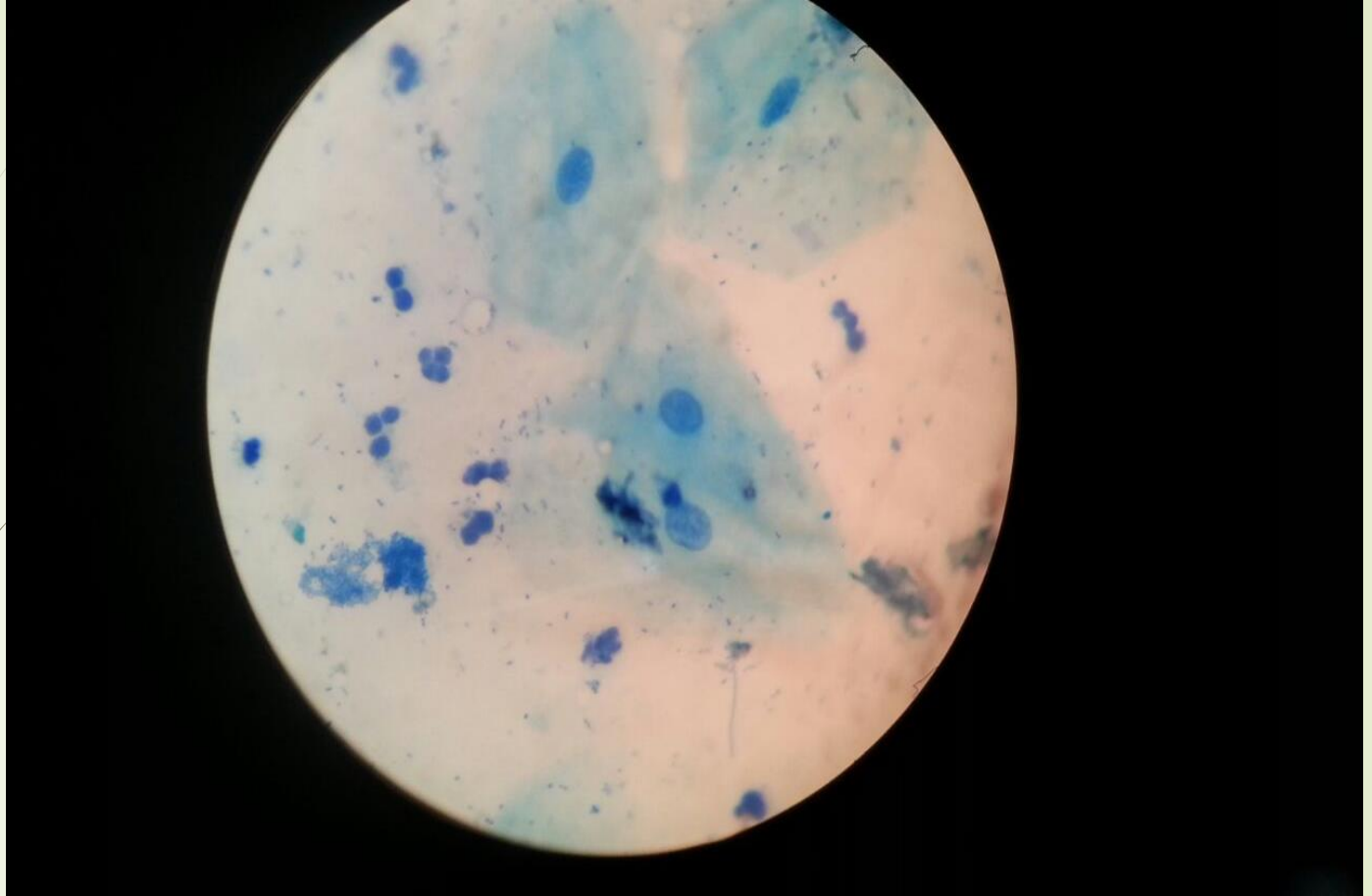
كريات بيض مختلفة

الزمرة الجرثومية الطبيعية الموجودة في الفم (مكورات , عصيات , ملتويات)

فطور (احيانا) خلايا خميرية 3-6 ميكرون ,خيوط فطرية قطرها 2-5 ميكرون

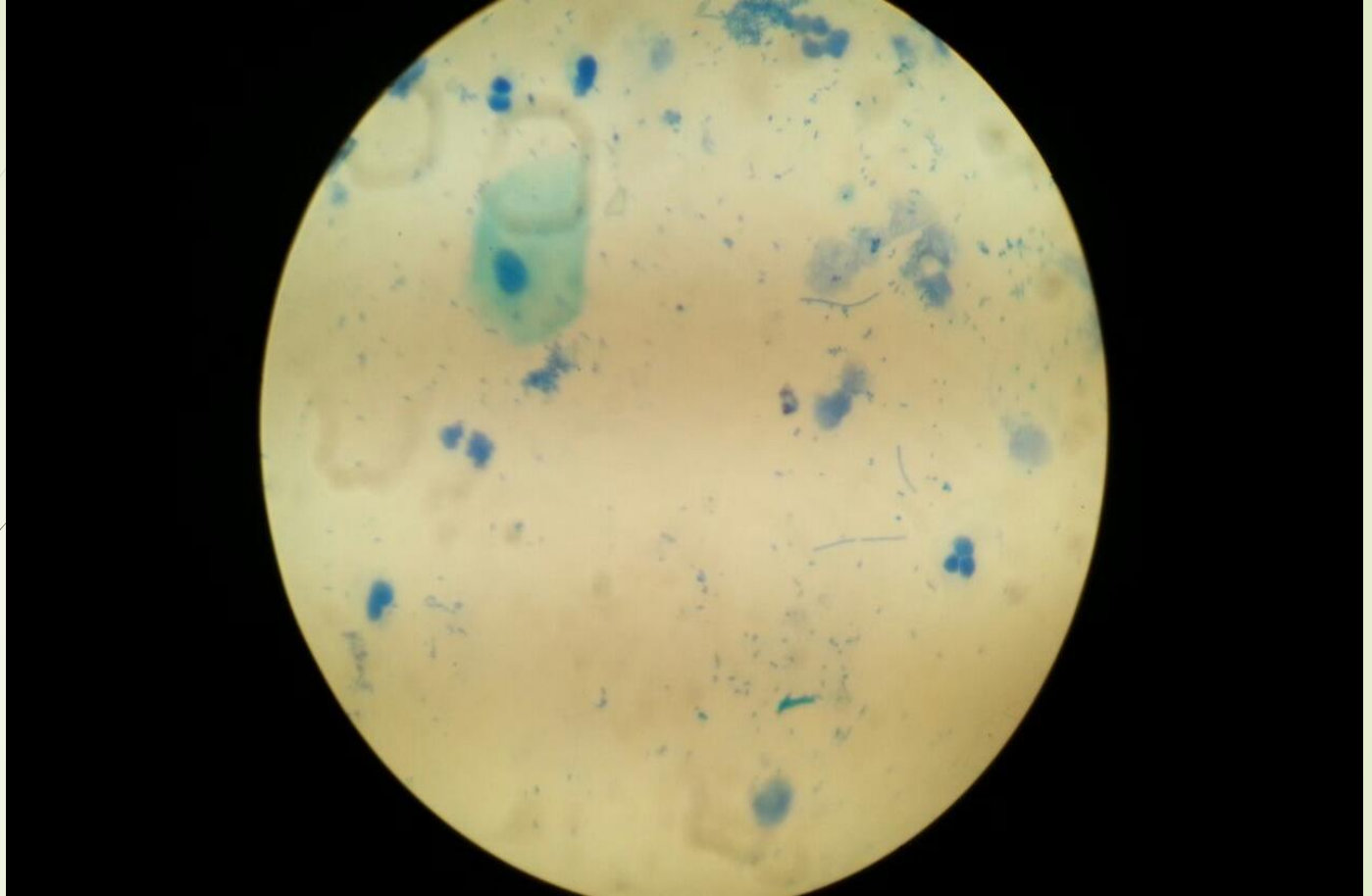


صورة الساحة المجهرية للطاخة جرثومية محضرة من اللعاب ملونة
بأزرق الميتلن



33

صورة الساحة المجهرية للطاخة جرثومية محضرة من اللعاب ملونة بأزرق الميتلن



34

صورة الساحة المجهرية للطاخة جرثومية محضرة من اللعاب ملونة بأزرق الميتلن