جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة المستقبل

# المزارع المايكروبية

## احياء مجهرية عملي

المرحلة الأولى

المحاضرة ٤

قسم التقنيات النباتات الطبية والنواتج الطبيعية

م.م. محمد علي ابوجزرة

# طريقة الزراعة الخطية Streak Plate Method

✅ **ما الهدف من الزراعة الخطية؟**

الهدف الأساسي هو **عزل مستعمرات بكتيرية نقية** من خليط يحتوي على أكثر من نوع أو من مستعمرات كثيفة.

- باستخدام هذه الطريقة، نخفف عدد الخلايا البكتيرية تدريجيًا عبر تمريرها في اتجاهات معينة على سطح طبق الأكار، حتى نحصل على **خلايا فردية** تنمو لاحقًا كمستعمرات منفصلة.

# الأدوات المطلوبة:

- طبق بتري يحتوي على وسط أجار (مثل Nutrient Agarأو MacConkey Agar)
- أنسيت معدنية أو بلاستيكية معقمة ((Inoculating Loop
- مصدر حرارة (لهب بنسن لتعقيم الأداة)
- عينة بكتيرية

# خطوات الزراعة الخطية بالتفصيل:

- ١. تعقيم الأنسة:مرّر الأنسة فوق لهب بنسن حتى تحمر لتعقيمها.
- لا تلمسها بعد اللهب حتى لا تتلوث.
- ٢- أخذ العينة:
- اغمس الأنسة في العينة البكتيرية (سائل أو من مستعمرة على طبق آخر).

# ٣. الرسم الخطّي على الطبق

◆ (التقسيم إلى ٤ مناطق): قسم السطح إلى ٤ مناطق (ربعين أو أكثر حسب التقنية)، واتبع هذا النمط:

- القطاع الأول: ابدأ من أعلى الطبق ومرر الأنسة عدة مرات ذهابًا وإيابًا.
- القطاع الثاني: عقّم الأنسة، ثم اسحب خطين أو ثلاثة من القطاع الأول ومددها لمنطقة جديدة.
- القطاع الثالث: عقّم مرة أخرى، وكرر نفس الفكرة.
- القطاع الرابع (الأخير): بنفس الطريقة، لكن بدون إعادة أخذ عينة – فقط تمديد لما بقي.

📌 الهدف: في كل انتقال، نقل كمية أقل من البكتيريا → حتى تصل لخلايا مفردة.

# ٤. الحضن (Incubation):

ضع الطبق مقلوبًا في الحاضنة عند درجة حرارة مناسبة (عادةً ٣٧° C للبكتيريا).

- ⏱️ بعد ١٨–٢٤ ساعة ← ستظهر مستعمرات.

# 👀 النتائج المتوقعة:

- في القطاع الأول ← نمو كثيف
- في الثاني والثالث ← أقل كثافة
- في القطاع الأخير ← مستعمرات منفصلة، نقية

# ٢- طريقة السكب Pour Plate Method

✅ **ما الهدف من هذه الطريقة؟**

- **عدّ البكتيريا (Colony Forming Units - CFUs).**
- الحصول على مستعمرات **داخل وسط الأكار وليس فقط على السطح**.
- دراسة أنواع البكتيريا التي تنمو في عمق الوسط وليس سطحه فقط.

# الأدوات المطلوبة:

- وسط أجار مغذٍّ سائل دافئ (حوالي ٤٥–٥٠°C)
- أنابيب تعقيم
- طبق بتري
- ماصة دقيقة (pipette)
- حاضنة (incubator)

# خطوات Pour Plate بالتفصيل:

1. تحضير الوسط: أذِب وسط الأجار (مثل Nutrient Agar) واحتفظ به عند درجة حرارة حوالي ٤٥°C.
2. إضافة العينة: ضع ١ مل من العينة البكتيرية المخففة في طبق بتري المعقم.
3. سكب الأجار: اسكب الوسط الأجار الدافئ مباشرة على العينة داخل الطبق. ⚠ يجب أن لا يكون الأجار ساخنًا جدًا حتى لا يقتل البكتيريا!
4. الخلط بلطف: حرك الطبق بشكل دائري بلطف لخلط الوسط بالعينة بالتساوي
5. التجمد (التحجّر): اترك الطبق ليبرد ويتصلب
6. الحضانة: ضع الطبق في الحاضنة عند ٣٧°C لمدة ٢٤ ساعة تقريبًا.

# 👀 النتائج المتوقعة

- مستعمرات تظهر:
- ✅ على السطح:
- ✅ داخل وسط الأجار
- يمكن عدّ المستعمرات وحساب CFU/mL لتحديد تركيز البكتيريا.
- 📌 متى نستخدم Pour Plate؟
- عند دراسة البكتيريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية
- لتحليل المياه، الأغذية، أو منتجات دوائية.
- في اختبارات الجودة الميكروبيولوجية.

# 🧫 Spread Plate Method طريقة الزراعة السطحية

🎯 **الهدف من الطريقة:**

- توزيع البكتيريا **بشكل متساوٍ** على سطح وسط الأجار.
- الحصول على **مستعمرات منفصلة**.
- حساب **عدد وحدات تكوين المستعمرات** (CFU/mL) بدقة.
- تستخدم في الفحوصات الميكروبيولوجية مثل:
  - جودة المياه والغذاء
  - فحص فعالية المضادات الحيوية
  - قياس تركيز البكتيريا

# الأدوات المطلوبة:

| الوظيفة | الأداة |
| --- | --- |
| وسط النمو | طبق بتري بأجار صلب |
| لنقل حجم دقيق من العينة | ماصة دقيقة (Pipette) |
| لنشر العينة | عصا زجاجية أو معدنية على شكل L (Spreader) |
| | مصدر حرارة |

# خطوات Spread Plate Methodبالتفصيل:

**1 تحضير التخفيفات (Serial Dilutions):**

- يتم تخفيف العينة الأصلية إلى ١:١٠، ١:١٠٠، ١:١٠٠٠ ... إلخ للحصول على عدد قابل للعد من المستعمرات.

**2 إضافة العينة للطبق:**

- باستخدام الماصة، ضع ٠,١ mLمن العينة المخففة على سطح طبق الأجار.

**3 نشر العينة:**

- باستخدام أداة ) L-shaped spreaderمعقمة)، قم بتحريك العينة على السطح بلطف في شكل دائري لتوزيعها بالتساوي.

# خطوات Spread Plate Methodبالتفصيل:

- 4 حضانة الطبق:ضع الطبق مقلوبًا في الحاضنة على درجة حرارة ٣٧° Cلمدة ١٨–٢٤ ساعة.
- 5 عدّ المستعمرات:بعد الحضانة، تُعد المستعمرات الظاهرة وتحسب CFU/mLكما تعلمنا في الرسالة السابقة.

# ✅ النتائج المتوقعة من Spread Plate Method

🎯 **الهدف الأساسي:**

- عدّ البكتيريا وحساب CFU/mL.
- الحصول على **مستعمرات منفصلة** وواضحة لتحديد النوع أو لاستخدامها في تجارب لاحقة.

# شكل النتائج على طبق الأجار:

| التفسير العلمي | النتيجة |
| --- | --- |
| البكتيريا قليلة ومنتشرة بشكل متساوٍ | مستعمرات منفصلة ((Discrete Colonies |
| توزيع العينة جيد باستخدام السبريدر | نمو متوازن على السطح |
| البكتيريا من نوع واحد | حجم المستعمرات متناسق |
| إشارة إلى نقاء العينة أو نوع واحد من البكتيريا | لون وخصائص موحدة للمستعمرات |

# التصبغ البسيط

- هو طريقة صبغ تستخدم **صبغة واحدة فقط** لتلوين الخلايا البكتيرية، بحيث تظهر الخلايا بلون واضح تحت المجهر، بينما يبقى الخلفية بلون فاتح أو شفاف،ولمقارنة الاشكال والتجمعات وحجم الخلايا البكتيرية، ويعتمد مبدأ العمل بالتصبيغ البسيط على استخدام عامل مصبغ واحد للمسحة البكتيرية.

# الهدف من التصبغ البسيط:

- تسهيل رؤية **الشكل** morphologyالعام للبكتيريا.
- تحديد **الحجم** و**الترتيب** مثل: مفردة، مزدوجة، سلاسل....
- لا يميز بين أنواع البكتيريا على عكس Gram Stain مثلًا.

## أنواع التطهير:

**التطهير الكيميائي**: باستخدام مواد مثل الكلور، الكحول، بيروكسيد الهيدروجين، والفينولات.

**التطهير الفيزيائي**: مثل الغليان، الحرارة الجافة، البخار، أو الأشعة فوق البنفسجية.

---

## المواد المستخدمة:

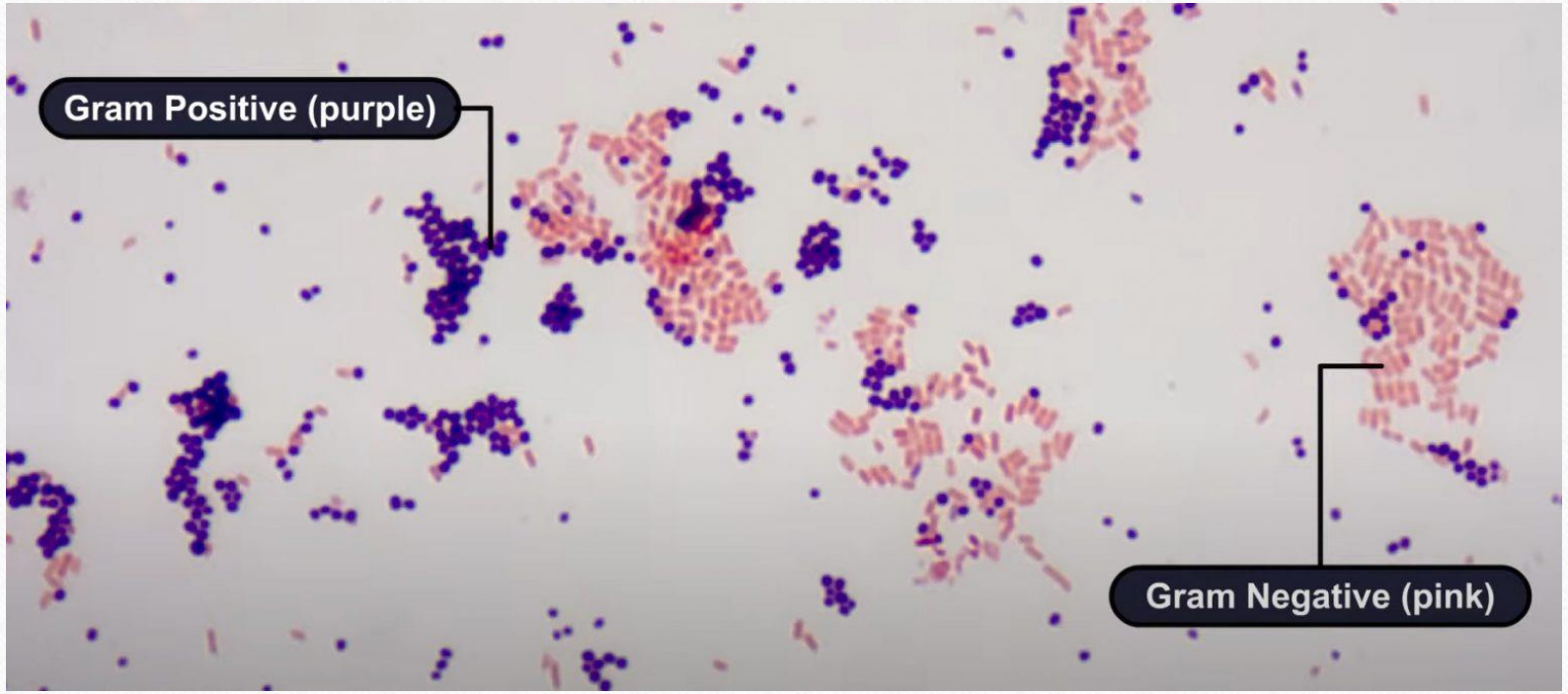
- صبغة واحدة مثل:
  - **Methylene Blue**الأزرق المثيليني
  - **Crystal Violet**البنفسجي البلوري
  - **Safranin**الصفارين

# خطوات التصبغ البسيط:

١. **تحضير الشريحة الزجاجية:**
   ١. خذ كمية صغيرة من مزرعة البكتيريا.
   ٢. افردها على الشريحة مع نقطة ماء.
   ٣. اتركها تجف بالهواء.
٢. **تثبيت العينة (Heat Fixing):**
   ١. مرّر الشريحة فوق لهب خفيف بسرعة لتثبيت العينة.
٣. **إضافة الصبغة:**
   ١. ضع الصبغة على العينة لمدة ١–٢ دقيقة.
٤. **الغسل بالماء:**
   ١. اغسل بلطف لإزالة الصبغة الزائدة.
٥. **التجفيف والفحص:**
   ١. جفف الشريحة باستخدام ورق نشّاف.
   ٢. افحص تحت المجهر (عدسة ١٠٠x مع زيت الغمر).

# كيف تظهر البكتيريا؟

- **البكتيريا تكون ملونة بلون الصبغة.**
- **الخلفية غالبًا عديمة اللون أو فاتحة.**
- مثال:
عند استخدام Methylene Blue → تظهر البكتيريا **زرقاء**.


Gram Positive (purple)
Gram Negative (pink)

# الصبغة التفريقية Differential Staining

هي تقنية صبغ تستخدم **أكثر من صبغة واحدة** لتمييز **أنواع مختلفة من البكتيريا** أو **مكونات الخلية** عن بعضها البعض. على عكس الـ Simple Stainاللي يلون كل الخلايا بلون واحد، فإن الـ Differential Stain **الهدف من الصبغة التفريقية:**

- **تمييز أنواع البكتيريا المختلفة** (مثل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام).
- **كشف الهياكل الخاصة** داخل أو حول البكتيريا (مثل الكبسولة، الأبواغ، الجدار الخلوي).
- معرفة تركيب الجدار الخلوي أو وجود مكونات مثل **المايسوليك أسيد** في البكتيريا الحمضية.
- يفرق بينها!

# الهدف من الصبغة التفريقية:

- **تمييز أنواع البكتيريا المختلفة** (مثل البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام).
- **كشف الهياكل الخاصة** داخل أو حول البكتيريا (مثل الكبسولة، الأبواغ، الجدار الخلوي).
- معرفة تركيب الجدار الخلوي أو وجود مكونات مثل **المايسوليك أسيد** في البكتيريا الحمضية.

# أشهر أنواع :Differential Staining

١. **صبغة غرام (Gram Stain)**

- البكتيريا **Gram Positive:** بنفسجية
- البكتيريا **Gram Negative:** وردية/حمراء
- يستخدم:
  - Crystal Violet
  - Iodine (مثبت)
  - Alcohol (مزيل)
  - Safranin (صبغة عكسية)

# صبغة غرام

## هي تقنية صبغ تفرق بين:

- البكتيريا الموجبة لصبغة غرام (Gram-positive) → تظهر بنفسجية
- البكتيريا السالبة لصبغة غرام (Gram-negative) → تظهر وردية أو حمراء

# خطوات صبغة غرام بالتفصيل:

**1 تحضير الشريحة:**

- افرد عينة من البكتيريا على شريحة زجاجية مع نقطة ماء.
- اتركها تجف في الهواء.
- ثم ثبتها بالحرارة (مررها بسرعة فوق لهب بنسن).

# 2 الصبغة الأولية: Crystal Violet

- ضع بضع قطرات منها على العينة.
- اتركها لمدة **١ دقيقة**.
- اغسل الشريحة بلطف بالماء.

# 3 المثبت: Iodine Solution

- أضف اليود واتركه لمدة **١ دقيقة**.
- هذا يشكّل معقدًا (صبغة+يود) يصعب خروجه من الخلايا.
- اغسل بالماء بلطف.

# 4 مزيل الصبغة: Alcohol / Acetone

- ضع الكحول لعدة **ثوانٍ (١٠–١٥ ثانية)** فقط.
- يعمل على:
  - إزالة الصبغة من البكتيريا **Gram-negative**.
  - إبقاء الصبغة في **Gram-positive**.
- اغسل بالماء مباشرة بعد الوقت المحدد.
- ⚠ (هذه أهم خطوة، ولو طولت فيها ممكن تطلع كل الخلايا وردية بالغلط!)

# 5 الصبغة العكسية: Safranin

- ضع بضع قطرات واتركها لمدة ١ **دقيقة**.
- تلوّن البكتيريا **Gram-negative** باللون الوردي.
- اغسل بالماء وجفف باستخدام ورق نشاف.

# 6 الفحص المجهري:

- افحص باستخدام عدسة الزيت (Oil Immersion – 100x).
- ستظهر:
  - ✅ **Gram-positive:** بنفسجية/أرجوانية
  - ❌ **Gram-negative:** وردية/حمراء

# 💡 لماذا الفرق في اللون؟

- **Gram-positive:** جدار سميك من الببتيدوغليكان يحتفظ بالصبغة.
- **Gram-negative:** جدار رقيق ووجود غشاء خارجي يجعل الصبغة تُغسل بسهولة.

# 2 صبغة مقاومة الحمض Acid-Fast Stain

- تستخدم لتمييز البكتيريا مثل ( *Mycobacterium tuberculosis* السل).
- البكتيريا مقاومة للحمض تظهر **حمراء** ((Carbol Fuchsin، والبقية **زرقاء** ( Methylene Blue).
- طريقة Ziehl-Neelsen هي الأشهر.

# Endospore Stain صبغة الأبواغ

- للكشف عن **الأبواغ الداخلية** في البكتيريا مثل *Bacillus* و*Clostridium*.
- الأبواغ تظهر **خضراء** (Malachite Green)، والخلايا **وردية** (Safranin).

# شكرا لكم