الدروس العملية لمقرر

نبات 5

لطلاب الفرقة الثالثة شعبة العلوم البيولوجية والجيولوجية

اعداد

د/ محمد احمد حسين

د/ رقية بهجت

للعام الجامعي 2023-2024

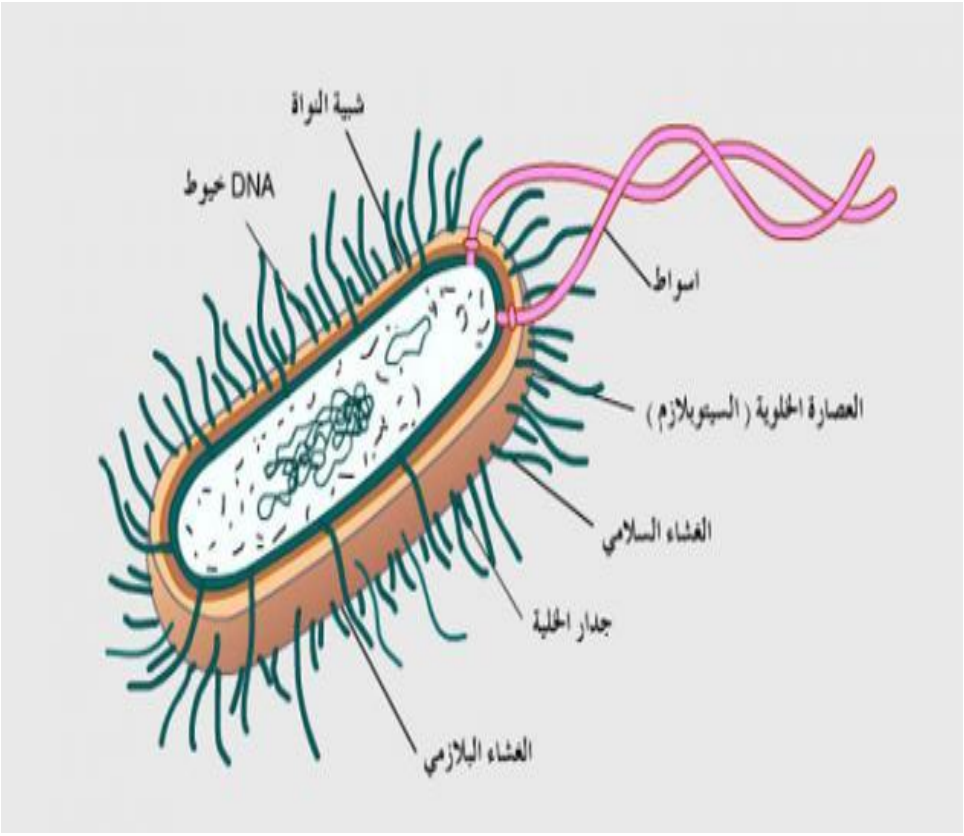
المحتوى العملى لجزء البكتيريا

علم البكتيريا

علم البكتريا:- هو احد فروع علم الميكروبيولوجي الذي يهتم بدراسة وتعريف البكتريا

البكتريا: هى عبارة عن كائنات دقيقة أولية النواة وحيدة الخلية لاتحتوي علي نواة ومعظمها لايحتوي علي عضيات مثل البلاستديات الخضراء والميتوكندريا ومعظمها يحتوي علي المادة الوراثية DNA

أشكال البكتريا:- يوجد أشكال كثيرة للبكتريا منها الكروي والعصوي وأشكال حلزونية.



أشكال البكتيريا الكروية

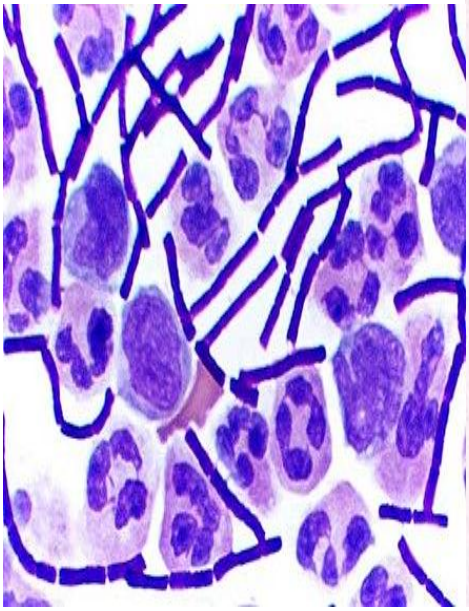
جدول (2) اشكال مختلفه من البكتيريا الكرويه

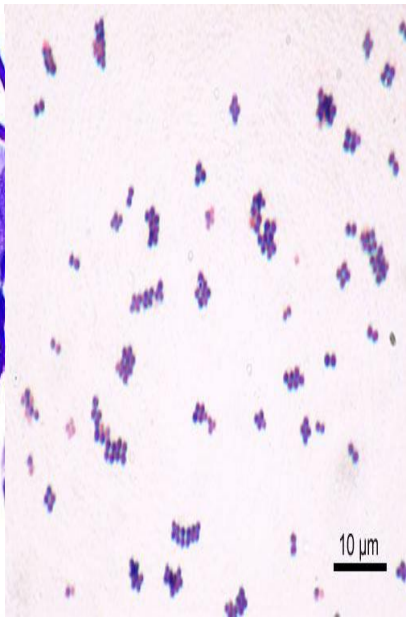
اسم تجمع	كروية
أحادية	
ثنائية	
رباعية	
ثمانية (مكعب)	
عنقودية	
سيحية	

أشكال البكتيريا العصوية

جدول(3) أشكال المختلفة من البكتيريا العصوية

اسم تجمع / شكل الخلية	عصوية
عصوية كورية أحادية	
عصوية ثنائية	
سلسلة من العصويات	





لماذا يجب السيطرة علي الكائنات الحية الدقيقة؟

- لمنع انتشار الأمراض والأوبئة
- لمنع تحلل وتلف المواد المهمة لدي الإنسان
- لمنع التلوث بالميكروبات الغير مرغوب فيها

طرق التحكم او السيطره على الكائنات الدقيقة

عوامل فيزيائية :- أ- درجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة.

ب- الإشعاع

ج- الضغط الاسموزي

د - الترشيح

ه- التجفيف

عوامل كيميائية:- أ- المطهرات antiseptic

ب – المطهرات Disinfectant

ج-المضادالحيوية Antibiotic

د-كيمياء علاجية مضادة للميكروبات Chemotherapeutic antimicrobial chemical

ه-المواد الحافظة

بعض التعريفات الهامة:-

١-التعقيم -:Sterilizationعبارة عن عملية يتم من خلالها قتل أو إزالة كل الكائنات الحية مثل البكتريا والفيروسات

٢-التطهير -:Disinfectionعبارة عن إزالة الكائنات الدقيقة من الأسطح الغير حية.

٣-المطهرات -: Antisepticعبارة عن عوامل كيميائية تستخدم في قتل وإزالة الكائنات الدقيقة وتكون أمنة للاستخدام البشري

٤-المطهرات -:Disinfectantعبارة عن عوامل كيميائية تستخدم في نزع الكائنات الدقيقة من الأسطح الغير حية واستخدامها سام للإنسان

٥-المضادات الحيوية -:Antibioticعبارة عن منتج ابيضي يستخرج من ميكروب لقتل ميكروب أخر

٦-الكيمياء العلاجية مضادة للميكروبات:- عبارة كيمياء تخليقية تستخدم علاجيا ضد الميكروبات

٧- -:Cidal=killerعبارة عن عامل يستخدم في قتل الكائنات الدقيقة

٨- -:Static=inhibitعبارة عن عامل يستخدم في تثبيط الكائنات الدقيقة

العوامل التي تؤثر علي نشاط الميكروب:-

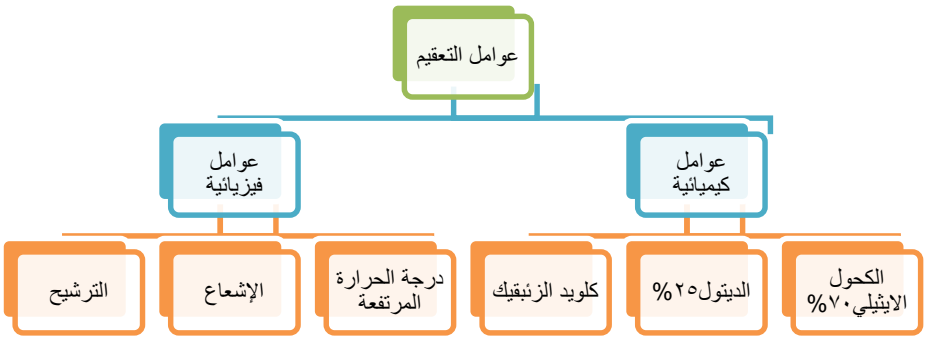
١) نوع وتركيز العامل الكيميائي المستخدم

٢) شدة و طبيعة العامل الفيزيائي المستخدم

٣) درجة الحرارة التي يستخدم عندها العامل الكيميائي و العامل الفيزيائي

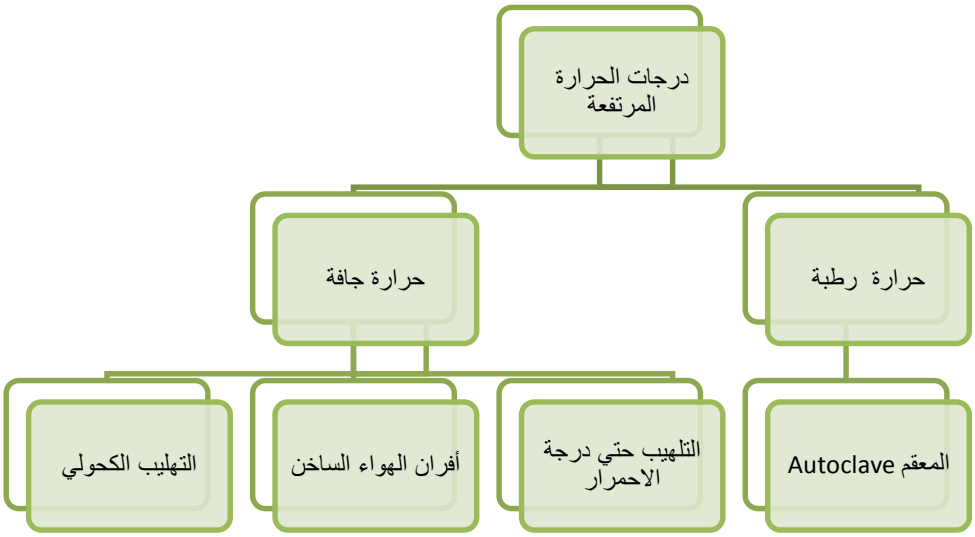
٤) الميكروب نفسه

٥) طبيعة المواد الحاملة للكائنات الدقيقة



العوامل الفيزيائية

- أولا درجات الحرارة المرتفعة :- تنقسم إلي حرارة جافة وحرارة رطبة
- الحرارة الجافة:- وهي استخدام الحرارة مباشرة في التعقيم
- الحرارة الرطبة:- وهي استخدام بخار الماء في التعقيم



اولا: استخدام الحرارة الجافة:

١- التلهيب حتي درجة الاحمرار:- هو استخدام لهب بنزين مباشر في التعقيم ويستخدم في تعقيم ابر التلقيح والملاقط والمشارط وفوهات أنابيب الاختبار.

٢- التلهيب الكحولي:- تغمس الاداة المراد تعقيمها فى الكحول الايثيلي اولا ثم تتعرض للهب بنزين مباشر ويستخدم في تعقيم الناشر الثلاثى وفوهات أنابيب الاختبار

٣-أفران الهواء الساخن:- درجة الحرارة لابد ان تكون من ١٦٠ -١٨٠درجة سيليزية وذلك لمدة من ٤-٦ ساعات. وتستخدم في تعقيم كل أنواع الزجاجيات مثل الماصات والكاسات والاطباق البترى.

ثانيا: درجات الحرارة الرطبة:-

المعقم-: Autoclaveجهاز يستخدم بخار الماء في التعقيم تحت ضغط جوي معين

شروط التعقيم في الاوتوكليف:-

١- درجة الحرارة المستخدمة١٢١درجة سيليزية

٢- الضغط الجوي المستخدم ١,٥ جو

٣-الوقت المستخدم٢٠- ٢٥دقيقة

الاستخدام:- يستخدم في تعقيم كل الأشياء والأوساط الغذائية ماعدا المواد التى تتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة مثل (الدم –الفيتامينات-الاحماض الامينية – المستخلصات النباتية)

لماذا درجة الحرارة الرطبة أكثر كفاءة من الحرارة الجافة؟

١-لان الوقت المستخدم في الحرارة الرطبة اقل من الوقت في الحرارة الجافة

٢-درجة الحرارة الرطبة تستخدم في تعقيم كل الأشياء

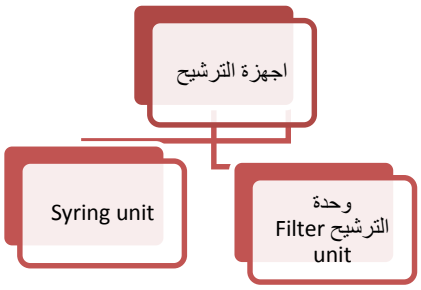
٣- الحرارة الرطبة أكثر كفاءة في قتل الخلايا الحية من الحرارة الجافة وذلك لأنها أكثر قدرة من التغلغل داخل الخلايا، كما أنها ذات قدرة أسرع على تجميع وتخثير البروتين الخلوي.

ثالثا الإشعاع:-

هو عبارة عن عامل فيزيائي يستخدم في التعقيم مثل الأشعة الفوق بنفسجية وأشعة جاما وأشعة اكس وهى اشعة كونية ضارة ولكن يمكن الاستفادة منها فى تعقيم المعامل.

ثالثا الترشيح:- عامل فيزيائي يستخدم في تعقيم الأوساط الغذائية التي تتأثر بدرجات الحرارة المرتفعة مثل (الدم –الفيتامينات-الاحماض الامينية – المستخلص النباتى)

الأجهزة المستخدمة في عملية الترشيح:-



أنواع المرشحات

١) مرشحات الاسبستوس:- تصنع من مادة الاسبستوس وثقوب ورقة الترشيح المستخدمة من٠,٢-٠,٤٥ميكرون.

٢) المرشحات الزجاجية:- تصنع من مادة السيليكا التي تستخرج من الرمال ويوجد خمس أنواع من المرشحات الزجاجية النوع الخامس هو الذي يستخدم في التعقيم لان ثقوب ورقة الترشيح المستخدمة من٠,٢-٠,٤٥ميكرون.

٣) المرشحات الغشائية:- تصنع من مواد بيولوجية التي تستخرج من الحيوانات مثل سترات السليلوز تستخدم في التعقيم لان ثقوب ورقة الترشيح المستخدمة من٠,٢-٠,٤٥ميكرون.

العوامل الكيميائية

١) الكحول الايثيلي٧٠%:- يستخدم في تعقيم الأرضيات وأسطح البنشات

٢) الفورمالين:- يستخدم في تعقيم الأرضيات وأسطح البنشات ويستخدم أيضا في حفظ العينات

٣) الديتول٢٥%:- يستخدم في تعقيم الأرضيات وأسطح البنشات

٤) كلوريد الزئبقيك:- يستخدم في تعقيم الأرضيات وأسطح البنشات

لماذا الكحول الايثيلي٧٠% اكتر كفاءة في التعقيم من الكحول الايتيلي١٠٠% ؟

لان الكحول الايثيلي٧٠% له القدرة علي اختراق الخلية البكترية ويعمل علي تخثر البروتوبلازم وقتل الخلية لذلك له تأثير قاتل للبكتريا Cidal

أما الكحول الايتيلي١٠٠% له القدرة علي نزع الماء من الخلية البكترية مما يؤدى إلي غلق ثقوب الغشاء البلازمي وبذلك يعمل علي تثبيط الخلية البكترية وبذلك له تأثير مثبط للبكتريا Static

الأوساط الغذائية

الأوساط الغذائية :-هي الأوساط التي تحتوي علي عناصر تحتاجها الخلية البكترية في عملية التكاثر والتغذية والنمو وتشمل هذه العناصر علي عناصر صغرى وعناصر كبرى.

العناصر الكبرى Major element :هي عناصر تحتاجها الخلية البكترية بكميات كبيرة في الوسط الغذائي لعملية النمو والتغذية مثل -H_2-O_2-N.K.Ca-Na-Mg-N

العناصر الصغرى Minor element: هي عناصر تحتاجها الخلية البكترية بكميات صغيرة في الوسط الغذائي لعملية النمو والتغذية مثل Al -Zn - Cu

أنواع الأوساط الغذائية

- تنقسم الأوساط الغذائية طبقا إلي:-

١) علي أساس القوام:-(صلبة –صلبة قابلة للإسالة-سائلة –شبة صلبة)

٢) علي أساس التركيب الكيميائي:- (معروفة التركيب الكيميائي – وغير معروفة التركيب الكيميائي)

٣) علي أساس الاستخدام (طبقا لأغراض خاصة):- (وسط مقوي -وسط اختياري -وسط تفريقي -وسط اختياري تفريقي)

أولا الأوساط الغذائية على أساس القوام:-

أ- أوساط غذائية صلبة:- وهي عبارة وسط غذائي لا يمكن تحويله إلي وسط غذائي سائل مثل شرائح البطاطس والجذروالكوسة.

ب- أوساط غذائية صلبة قابلة للإسالة:- وهي وسط غذائي يحتوي علي عوامل مصلبة مثل الاجار والجيلاتين (١٥-٢٠ جرام فى اللتر).

ت- أوساط غذائية شبة صلبة:- وهي وسط غذائي يحتوي علي عوامل مصلبة مثل الاجار والجيلاتين بنسبة اقل من الوسط الصلب القابل للاسالة حوالى ٥ جم.

ث- أوساط غذائية سائلة:- وهي وسط غذائي لا يحتوي علي أي مواد مصلبة مثل nutrient broth

لماذا يستخدم الأجار كمادة مصلبة أفضل من استخدام الجيلاتين ؟

١-لان نقطة انصهار الأجار اعلي من نقطة انصهار الجيلاتين أي أن الأجار يتحمل درجات الحرارة العالية أكثر من الجيلاتين. فالاجار يصبح سائل عند درجة حرارة اكبر من ٤٥ ويصبح صلب عند درجات حرارة اقل ٤٥. اما الجيلاتين يصبح سائل عند درجة حرارة اكبر من ٣٥ ويصبح صلب عند درجة حرارة اقل من ٣٥ درجة.

٢- لان الجيلاتين هو مادة بروتينية يحدث لها تحلل مائي أي تستطيع الخلية البكترية أن تستخدمها في عملية التغذية.

ثانيا الاساط الغذائية علي أساس التركيب الكيميائي:-

١. معروفة التركيب الكيميائي:- هى التى يدخل فى تركيبها بعض المواد المعروفة التركيب مثل نترات الصوديوم.

٢. غير معروفة التركيب الكيميائي:- وهى الاوساط الغذائية التى يدخل فى تركيبها بعض المواد الطبيعية سواء كانت نباتية او حيوانية مثل الدم او سيرم الدم او مستخلصات اللحم او شرائح البطاطس والجذر.

ثالثا الاساط الغذائية طبقا لأغراض خاصة:

أشكال الأوساط الغذائية:-

١. الوسط الغذائي السائل Broth tube عبارة عن أنبوبة اختبار تحتوي علي الوسط الغذائي السائل

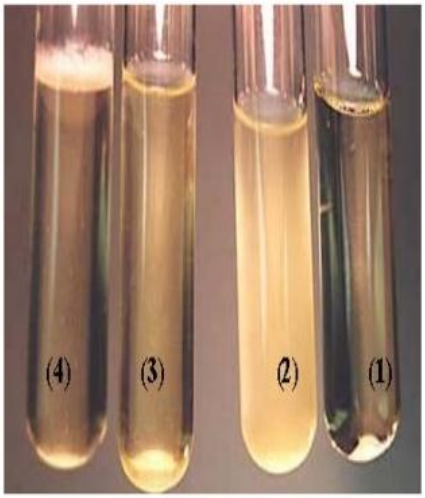
- أشكال الوسط الغذائي السائل:له ٣ أشكال

أ-شكل عكارة: النمو البكتيري في الوسط الغذائي يكون عكارة

ب-شكل راسب: النمو البكتيري في الوسط الغذائي يكون راسب في قاع الأنبوبة

ج-شكل قرص: النمو البكتيري في الوسط الغذائي يكون علي هيئة قرص علي سطح الأنبوبة

- بعض المصطلحات المستعملة في وصف نمو البكتيريا منها:-
- عكارة صافية Uniform turbidity
- غير واضحة or clumps Flocculent
- راسب Sediment
- غشاء أو حلقة على السطح Ring or pellicle growth on surface (شكل 29).



شكل(29) يوضح نمو البكتيريا في المرق داخل أنابيب الاختبار
1.المراقب بدون تلقيح. 2. عكارة صافية 3. راسب 4. غشاء أو حلقة على السطح

٢-الأجار المائل Agar slant عبارة عن أنبوبة اختبار تحتوي علي الوسط الغذائي الصلب قابل للإسالة في وضع مائل وتستخدم هذه الطريقة غي حفظ البكتريا لفترة طويلة

٣- أطباق الأجار Agar plateعبارة عن أطباق بتري تحتوي علي الأجار تستخدم هذه الطريق في عزل البكتريا وعمل تحت مزارع من البكتيريا.

٤- Deep agar(stap agar)عبارة عن أنبوبة اختبار تحتوي علي الأجار في ضع مستوي ولنمو البكتريا في هذا النوع يتم حقن البكتريا في الأجار وهذا الوسط مناسب في نمو البكتريا اللاهوائية.

صباغة الخلية البكتيرية

- لماذا نصبغ الخلية البكتيرية؟

١- لمعرفة الشكل المورفولوجي وترتيب الخلايا وذلك لان البكتيريا عديمة اللون.

٢-لتفرقة بين مجموعتين من السلالات البكتيرية

٣-لمعرفة التراكيب الداخلية للبكتريا

أنواع الصباغة

١-صباغة بسيطة (مباشرة –غير مباشرة)

٢-صباغة تفريقية (صباغة جرام –صباغة البكتيريا المقاومة للأحماض)

٣-صباغة تركيبية (صباغة الاسواط –صباغة الجدار الخلوي-صباغة الجراثيم الداخلية)

الأصباغ

هى عبارة عن املاح غالبا ما تكون من مشتقات وهى متعادلة الشحنة وعند ذوبانها فى الماء تعطى الشقيين الوجب والسالب او هى مركبات عضوية حامضية أو قاعدية تستخرج طبيعيا من النباتات وصناعيا من

البترول يتكون من شقين شق ملون chromophore وشق غير ملون exochrome وتسمى الصبغة قاعدية او موجبة اذا كان الشق الملون او الكروموفورم هو الموجب وتسمى حامضية اذا كان الشق الملون هو السالب.

لماذا عند صباغة الخلية البكتيرية تستخدم صبغة قاعدية؟

لان الخلية البكتيرية تحمل شحنة سالبة والصبغة القاعدية تحمل شحنة موجبة يحدث تجاذب بين الصبغة والخلية البكتيرية وتنشا بينهما رابطة ايونية ضعيفة.

خطوات الفيلم البكتيري في صباغة الخلية البكتيرية

١-نحضر شريحة نظيفة جافة

٢- نضع قطرة من الماء في منتصف الشريحة الزجاجية

٣-ناخذ السلالة البكتيرية بواسطة إبرة التلقيح بعد تعقيمها

٤- نمزج السلالة البكتيرية مع قطرة الماء في شكل بيضاوي

٥- نفرد السلالة البكتيرية علي الشريحة

٦- نترك الشريحة تجف في درجة حرارة الغرفة

٧- نقوم بتثبيت اللهب وذلك بتمرير الشريحة فوق لهب بنزين المباشر من(٢-٣) مرات في جميع الصباغات ماعدا الصباغة السالبة

- خطوات الصباغة المباشرة.

تستخدم في صباغة الخلية البكتيرية مباشرة ونستخدم صبغة موجبة وهي ازرق المثيلين

١- نحضر الفلم البكتيري علي شريحة نظيفة مع تثبيت اللهب

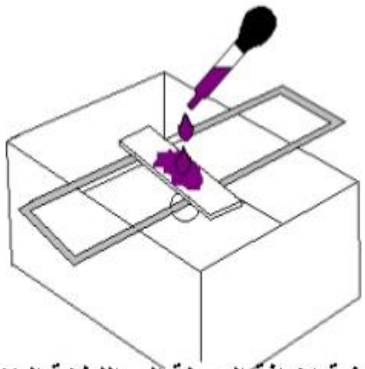
٢- نغطي الشريحة بصبغة ازرق المثيلين لمدة دقيقة

٣- نغسل الشريحة بما الصنبور

٤- نجفف الشريحة بورقة ترشيح نظيفة

٥ نضع نقطة من زيت سيدر ونفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية

1. **وضع الشريحة على حامل الصبغ (شكل 45)، أو تمسك بملقاط معدني.**



شكل(45) كيفية إضافة الصبغة إلى اللطخة البكتيرية

2. **تغمر اللطخة بأزرق المثيلين، لمدة 30 – 60 ثانية**
3. **تغسل الشريحة بالماء المقطر، بعناية لإزالة الصبغة الزائدة، بواسطة أنبوب قنينة الماء المقطر.**
4. **تجفف اللطخة برفق، بورق ماص للرطوبة، وتترك لتجف.**

- خطوات الصباغة الغير مباشرة.

تستخدم في صباغة الخلية البكتيرية غير مباشرة وذلك بصباغة الأرضية ونستخدم صبغة سالبة وهي النيجروسين لونها اسود

١- نحضر الفلم البكتيري علي شريحة نظيفة بدون تثبيت اللهب

٢-نغطي الشريحة بصبغة النيجروسين

٣- بواسطة شريحة أخري نظيفة ننشر الفلم البكتيري والصبغة

٤-نترك الشريحة تجف في درجة حرارة الغرفة

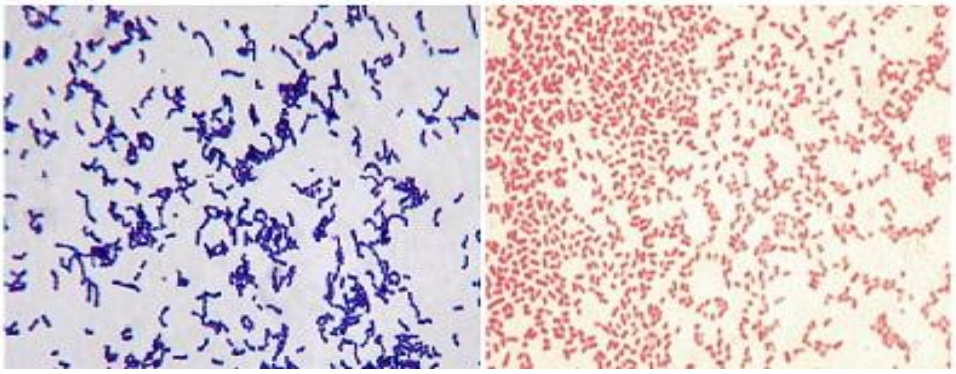
٥ نضع نقطة من زيت سيدر ونفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية

- **خطوات العمل**
- **تستعمل الشرائح النظيفة، والخالية من المواد الدهنية.**
- **توضع قطرة صغيرة من الصبغة الحامضية، النيكروسين، على إحدى طرفي الشريحة.**
- **تؤخذ عينة من المزرعة الصلبة، ملء العقدة المعدنية ، مع قطرة من صبغة نيكروسين، وتترك لتجف بدون توزيعها.**
- **تلمس القطرة بأحد طرفي شريحة أخرى ، وتحرك الأخيرة يميناً ويساراً، يجب توزعً البكتيريا والصبغة،لتغطي اللطخة بالتدريج من لون المعتم إلى لون الرمادي (49).**

شكل(49) طريقة الصبغ السالب للبكتيريا

الصباغة التفريقية

- صباغة جرام



Gram Stain - YouTube.webm

• صبغ البكتريا بصبغة جرام

- اكتشف هذه الطريقة هانس جرام في 1884، عندما لاحظ أن البكتيريا تفقد لون الصبغة، عند التخلص من الزائد منها. وتستعمل هذه الطريقة في تشخيص وتصنيف البكتيريا، وتقسيمها إلى مجموعتين، سالبة ، وموجبة لصبغة الجرام. ويرجع الفرق بين الصفتين الموجبة والسالبة، لمكونات الجدار الخلوي البكتيري.
- وتعتمد هذه الطريقة على أربعة خطوات هي:-

1. استخدام الصبغة الرئيسية (Crystal violet)، لصبغ جميع البكتيريا باللون البنفسجي.
2. يستخدم الأيودين Iodine، لزيادة الروابط الأيونية بين الصبغة الرئيسية والبكتيريا.
3. يستخدم الكحول الأثيلي، أو الأسيتون كمادة مزيلة للصبغة من بعض البكتيريا، بينما تحتفظ البعض منها بلونها.
4. تستخدم مادة السفرانين Safranin، في صبغ البكتيريا التي فقدت صبغتها بالكحول أو الأسيتون، باللون الأحمر.

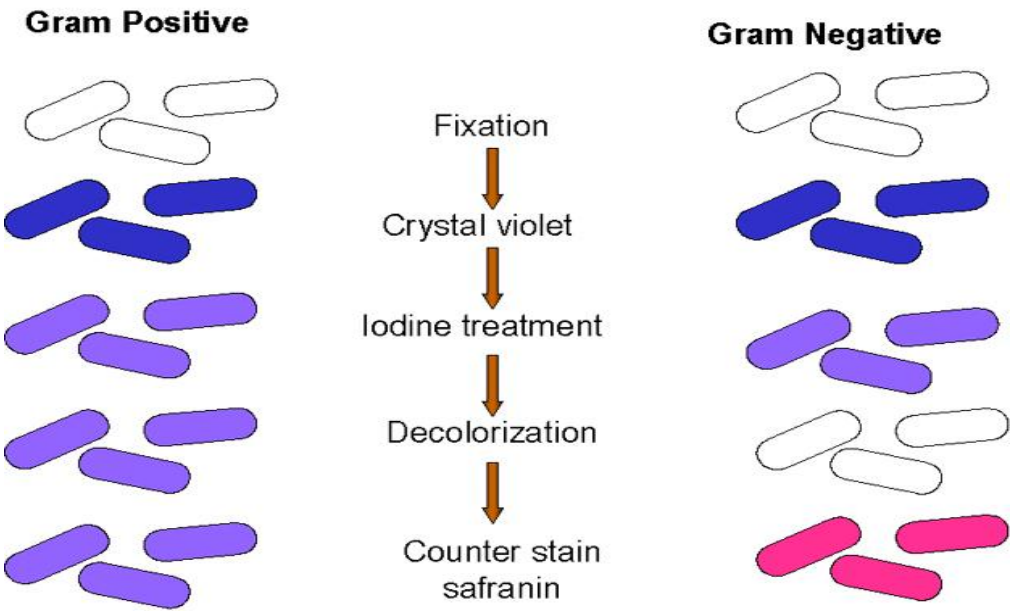
Gram stain 1.mp4 - YouTube.webm

- تسمى البكتيريا التي فقدت لون الصبغة الرئيسية بكتيريا سالبة لصبغة الجرام، أما التي احتفظت بلون الصبغة الرئيسية تعرف باسم بكتيريا الموجبة لصبغة الجرام.

• نظرية آلية صبغة الجرام :

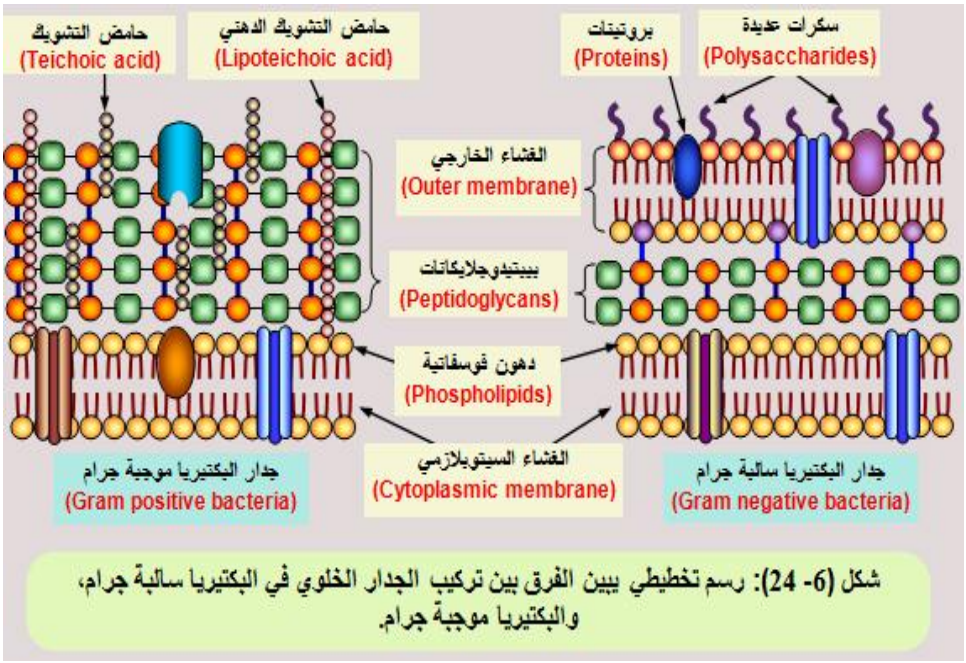
- تعتمد هذه النظرية على النقاط التالية:-

1. تختلف البكتيريا لتقبلها الصبغة الرئيسية والصبغة الثانوية.
2. جدار الخلية الموجبة لصبغة الجرام؛ أكثر سمكا من جدار خلية البكتيريا السالبة لصبغة الجرام ، من حيث التركيب الكيميائي.



جدول (2) مقارنة تركيب الجدر الخلوي في البكتيريا السالبة والبكتيريا الموجبة لصبغة جرام

البكتيريا السالبة لصبغة جرام (لون أحمر أو زهري).	البكتيريا الموجبة لصبغة جرام (لون بنفسجي مزرق).
يتكون من طبقات متعددة أقلها طبقتين.	يتكون من طبقة واحدة متجانسة.
يحتوي على نسبة عالية من الدهون تقدر بين 11- 22 % من الوزن الجاف للجدار.	لا يحتوي على دهون أو قد يحتوي على نسبة ضئيلة تصل إلى 3 %.
يحتوي على سكريات أمينية بنسبة منخفضة بين 2- 8 %	يحتوي على نسبة عليه من السكريات الأمينية بين 11- 22 %.
تحتوي على كل الأحماض الأمينية التي توجد في البروتينات.	تحتوي على عدد محدود من الأحماض الأمينية.



شكل (6- 24): رسم تخطيطي يبين الفرق بين تركيب الجدار الخلوي في البكتيريا سالبة جرام، والبكتيريا موجبة جرام.

خطوات صباغة جرام

١-نحضر الفلم البكتيري علي شريحة نظيفة مع تثبيت اللهب

٢-نغطي الفلم البكتيري بالصبغة الأولية (بلورات بنفسجية) لمدة دقيقة

٣-نغسل الشريحة بما الصنبور من اعلي لأسفل

٤-نغطي الفلم البكتيري بالمثبت (يود صبغة جرام)لمدة ٣٠ ثانية

٥-نغسل الشريحة بالعوامل المزيلة (الايثانول – الأسيتون) قطرة قطرة

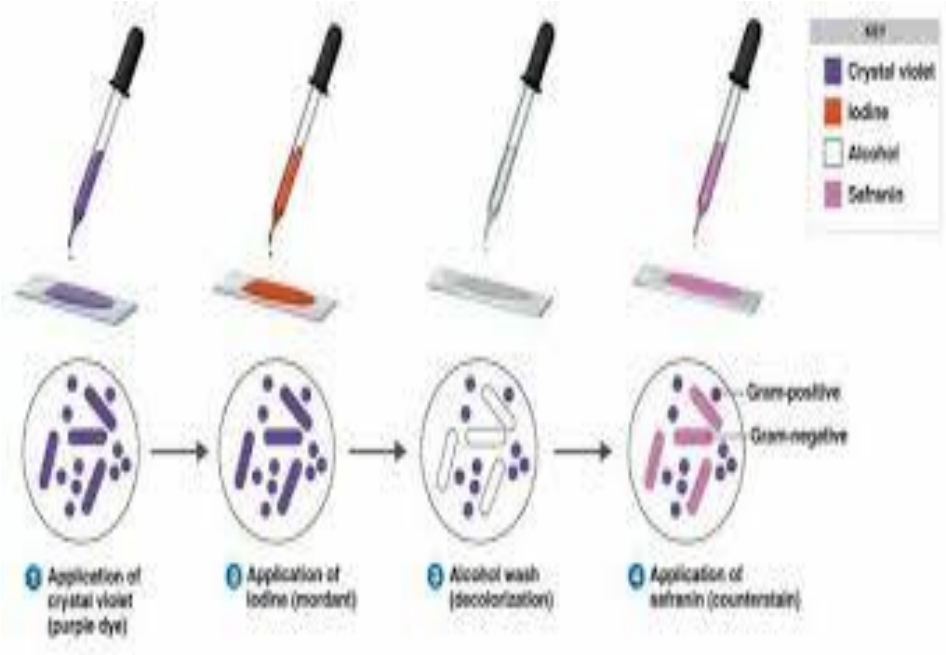
٦-نغسل الشريحة بما الصنبور من اعلي لأسفل

٧-نغطي الفلم البكتيري بالصبغة الثانوية (الصفرانين) احمر اللون

٨-نغسل الشريحة بما الصنبور من اعلي لأسفل

٩-نجفف الشريحة بورقة ترشيح نظيفة

١٠-نضع نقطة من زيت سيدر ونفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية



- علل

عند إضافة العوامل المزيلة (الايثانول) للبكتريا تزيل لون الصبغة الأولية(بلورات بنفسجية) في حالة البكتريا سالبة جرام بينما البكتريا موجبة صبغة جرام تحتفظ بلون الصبغة الأولية؟

يرجع ذلك إلي تركيب الجدار الخلوي للبكتيريا حيت البكتيريا موجبة صبغة جرام يتركب الجدار الخلوي من طبقات عديدة من الميورين (عديدات البيبتيد) لذلك الايتانول لا يستطيع إذابة هذه الطبقات واختراق الجدار

أما ف حاله البكتريا سالبة جرام يتكون الجدار من ٢-٣ طبقات من عديدات الببتيد و٣ طبقات من الدهون يستطيع الايثانول إذابة طبقات الدهون واختراق الجدار الخلوي وإذابة لون الصبغة الأولية

الصباغة التركيبية

١- صباغة الجراثيم الداخلية:-

هو نوع من الصباغة التركيبية يستخدم لمعرفة وجود جراثيم للبكتيريا أم لا ويحدد أيضا موضع الجراثيم

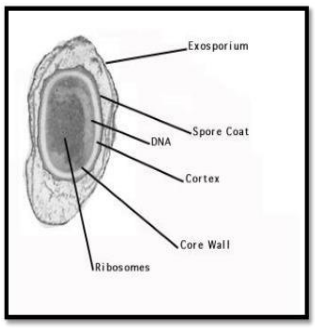
الجراثيم الداخلية للبكتيريا:-

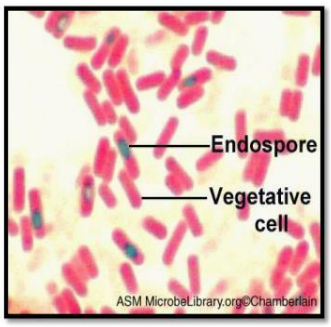
عبارة عن الطور الغير نشط للخلية البكتيرية التي تقاوم الظروف الغير مناسبة مثل

- درجات الحرارة العالية
- الإشعاع
- الضغط الاسموزي
- التجفيف

صبغ الجراثيم البكتيرية Staining of Bacterial Spores

تعتبر الجراثيم البكتيرية ذات أهمية كبرى في التصنيف البكتيري للأنواع المختلفة وعادة تحاط الجراثيم بجدار سميك ومتماسك، والجراثيم الداخلية من المعروف أنها بطبيعتها مقاومة لتقبل الأصباغ فبتالي لا يمكن لطرق الصبغ العادية التي تستعمل في صبغ الخلايا الخضرية للبكتيريا أن تؤدي إلى صبغها، لذلك يستعان بطرق أخرى تستغل الحرارة لتسهيل إدخال الصبغة خلال جدار الجرثومة فإنها تثبت بها ويصعب إزالتها منها، وهنا سيتم صبغ الخلايا البكتيرية بطريقة
. Shaeffer & Fulton





- لماذا الجراثيم أكثر مقاومة من الخلية الخضرية للبكتيريا؟

لان الجراثيم محاطة بطبقات بروتينية عديدة

- موضع الجراثيم داخل الخلية البكتيرية

١-جراثيم طرفية terminal: Ex: *Bacillus sp*

٢- جراثيم تحت طرفية sub terminal: Ex: *Bacillus subtillus*

٣- جراثيم مركزية central: Ex: *Bacillus cereus*

٤-تشبه المطرقة drumstick: Ex: *Clostridium tetani*

- الجراثيم موجبة الشحنة لذلك تصبغ بصباغة سالبة الشحنة وهي صبغة اخضر الملاكيت

- خطوات الصباغة:-

١-نحضر الفلم البكتيري علي شريحة نظيفة مع تثبيت اللهب

٢-نغطي الشريحة بقطعة من ورقة الترشيح

٣-نشبع ورقة الترشيح بصبغة اخضر الملاكيت

٤-نضع الشريحة فوق كاس به ماء مغلي لمدة ٥ دقائق مع الحفاظ أن تكون الشريحة رطبة بصبغة اخضر الملاكيت

٥-نزيل ورقة الترشيح بواسطة إبرة التلقيح

٦-نغسل الشريحة بماء الصنبور من اعلي لأسفل

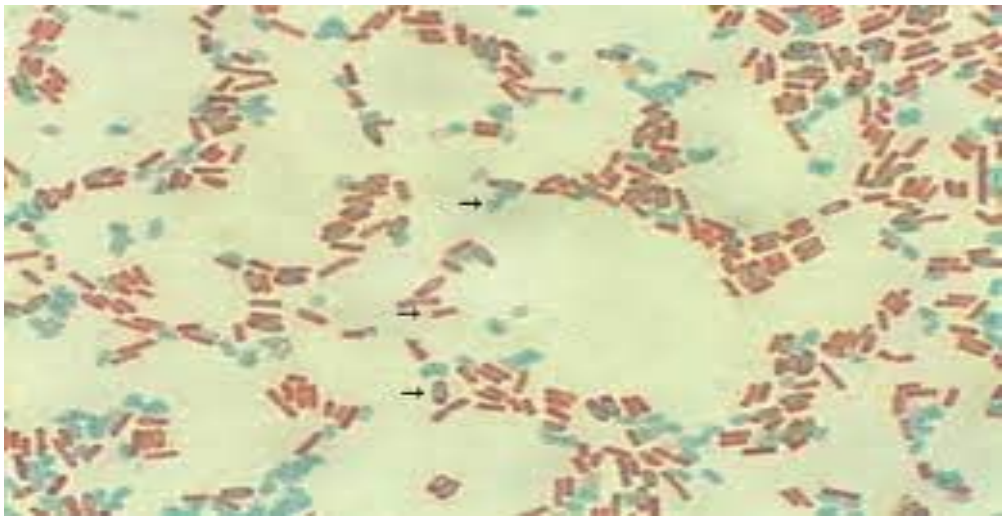
٧-نغطي الشريحة بصبغة الصفرانين لمدة دقيقة

٨-نغسل الشريحة بماء الصنبور من اعلي لأسفل

٩-نجفف الشريحة بورقة ترشيح نظيفة

١٠-نضع نقطة من زيت سيدر ونفحص الشريحة تحت العدسة الزيتية

SOLBRILLERSALG.COM
10µm



علل

لماذا عند صباغة الجراثيم الداخلية للبكتيريا توضع الشريحة فوق كاس به ماء مغلي؟

لان الجراثيم محاطة بمواد شمعية (أغلفة بروتينية عديدة) تمنع البكتيريا من الصباغة وبخار الماء يعمل علي إزالة هذه الطبقات فتسهل عملية الصباغة

الايض البكتيري

هو كل التفاعلات البيوكميائيه التي تحدث داخل الخلية البكتيرية

بواسطة الانزيمات وتشمل تفاعلات الهدم والبناء

- تفاعلات الهدم:-

عباره عن تكسير الجزيئات كبيرة الحجم (المعقدة)الي جزيئات صغيرة الحجم (البسطة) لكي نحصل علي الطاقة والمغذيات

- تفاعلات البناء:-

عباره عن تجميع جزيئات صغيرة الحجم (البسطة) الي الجزيئات كبيرة الحجم (المعقدة) للحصول علي التراكيب الداخلية

- الانزيمات:-

مركبات بروتينية تحتوي علي مراكز نشطة

انواع الانزيمات

انزيمات خارجية:-

وهي الانزيمان التي تفرز داخل الخلية البكتيرية وعملها خارج الخلية البكتيرية

الانزيمات الداخلية:-

وهي الانزيمان التي تفرز داخل الخلية البكتيرية وعملها ايضا داخل الخلية البكتيرية

هدم المواد الكربوهيدراتية

هي مركبات عضوية تحتوي علي الكربون والهيدروجين و الاكسجين بنسبة ١:٢:١

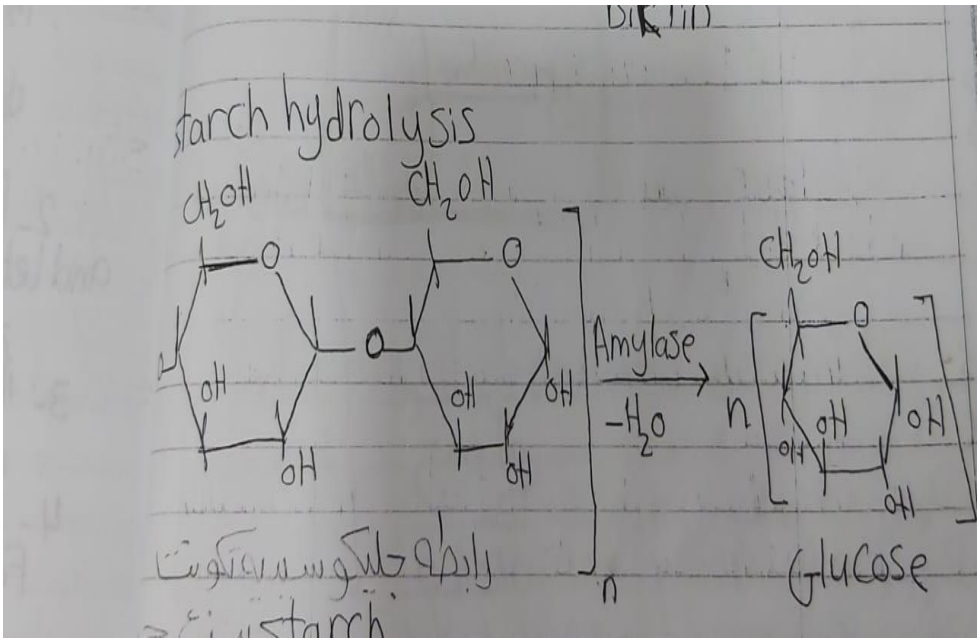
انواع المواد الكربوهيدراتية :-

١-السكريات الاحادية:- الجلوكوز والفركتوز

٢-السكريات الثنائية:- الاكتوز و السكرز والمالتوز

٣-السكريات العديدة:-النشا والسليلوز

التحليل المائي للنشا:-



الخطوات:-

١- نحضر الوسط الغذائي starch agar في الدورق مع تعقيمة في المعقم

٢-نصب الوسط االغذائي ف اطباق بتري ونتركه يتصلب في درجة حرارة الغرفة

٣-نلقح الاطباق بسلالات بكتيرية مختلفة

٤-نحضن الاطباق في الحضان لمدة ٢٤ ساعة

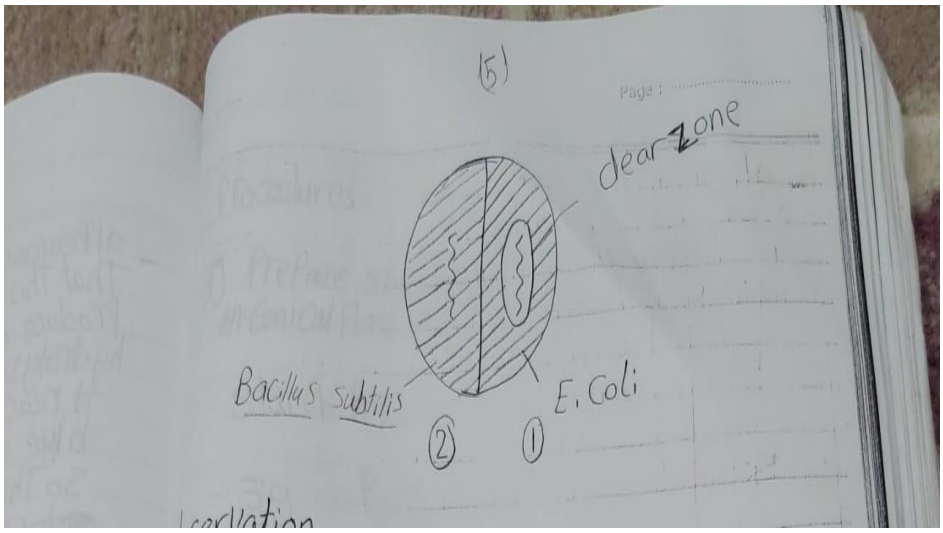
٥-بعد فترة التحضين نضيف اليود الي الاطباق لمدة خمس دقائق

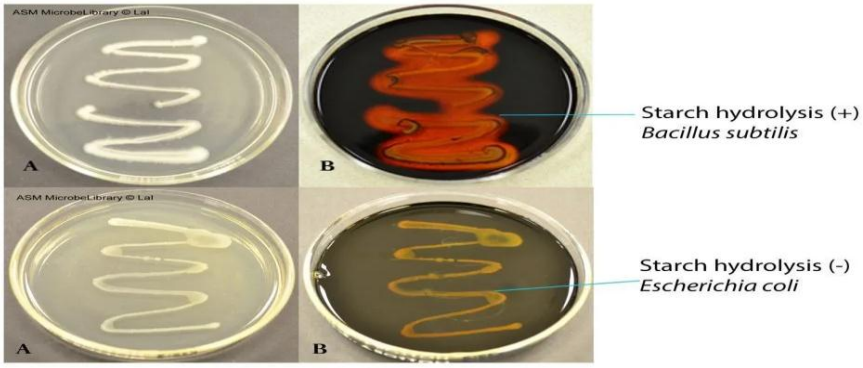
٦-نزيل الزيادة من اليود

المشاهدة:-

١-ظهور منطقة بيضاء شفافة حول النمو ابكتيري

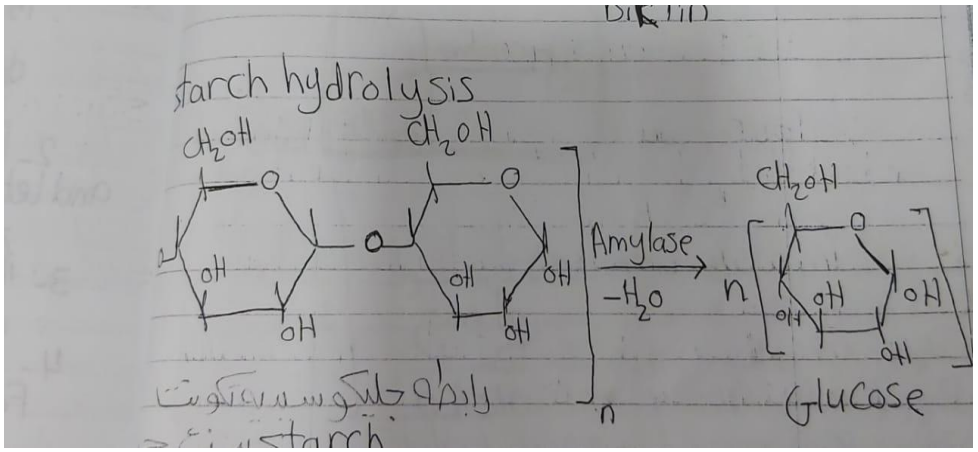
٢-تكون لون ازرق





التعليق:-

١-ظهور منطقة شفافة يوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة علي افراز انزيم الاميليز لذلك حدث تحلل مائي للنشا وتكون الجلوكوزوهذا يوضع ان اسلالة البكتيرية استخدمت النشا ف التغذية طبقا للمعادلة



٢-ظهور لون ازرق يوضح ان السلالة البكتيرية ليس لها القدرة علي افراز انزيم الاميليز لذلك لم يحدث تحلل مائي للنشا وتكون الجلوكوزوهذا يوضع ان اسلالة البكتيرية لم تستخدم النشا ف التغذية

طبقا للمعادلة

نشا +يود = لون ازرق

٢-اكسدة وتخمر السكريات الاحادية:-

الاكسدة:- تكسير الجلوكوز الي ماء وثاني اكسيد الكربون في وجود الاكسجين طبقا للمعادلة

Glucose+ انزيمات الاكسدة ← $CO_2 + H_2O$ (H_2CO_3)

التخمر :-تكسر الجلوكوز الي حمض الجلوكونيك في وجود او غياب الاكسجين

طبقا للمعادلة

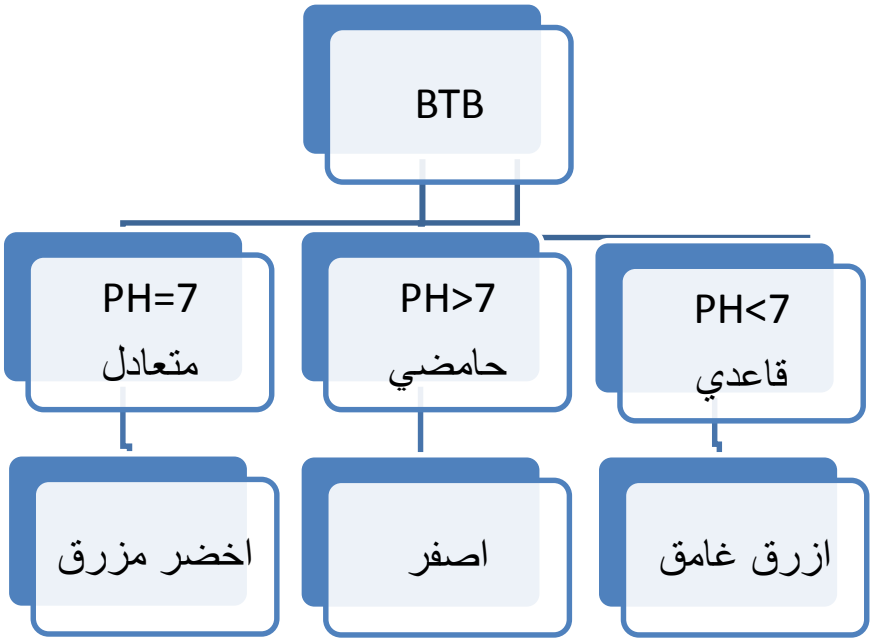
انزيمات التخمر

Glucose + انزيمات التخمر← Gluconic acid

الوسط الوستخدم هو وسط الاكسدة والاختزال يتكون من :-

١٠جرام بيبتون ،٥جرام جلوكوز ،٣ جرام مستخلص لحمي

يذاب في لترماء مقطر،٠,٠٦٥جرام دليل ازرق برومو ثيمول



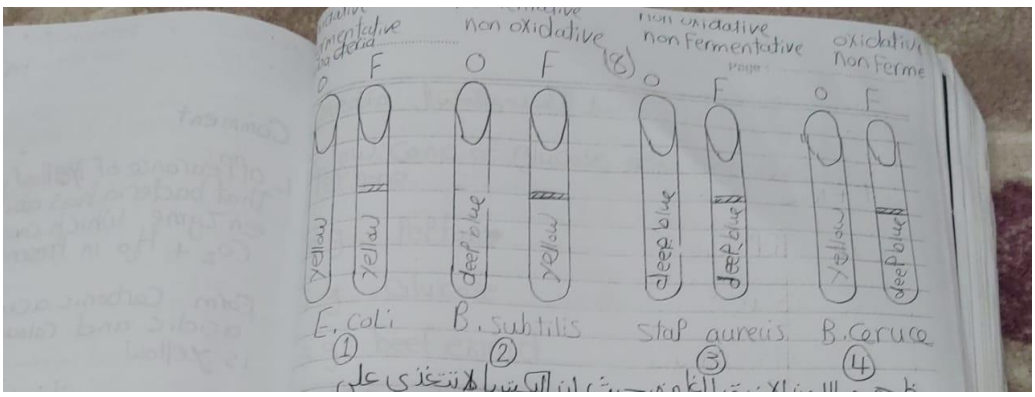
الخطوات:-

١- نحضر وسط الاكسدة والاختزال ف انابيب م التعقيم في المعقم (hugh (leifson medium

٢-نلقح الانابيب بسلالات بكتيرية مختلفة

٣- وضع زيت البارافين في انبوبة التخمر

٤-نحضن الانابيب في الحضان لمدة ٢٤ ساعة ند درجة حرارة٣٧سليزيه



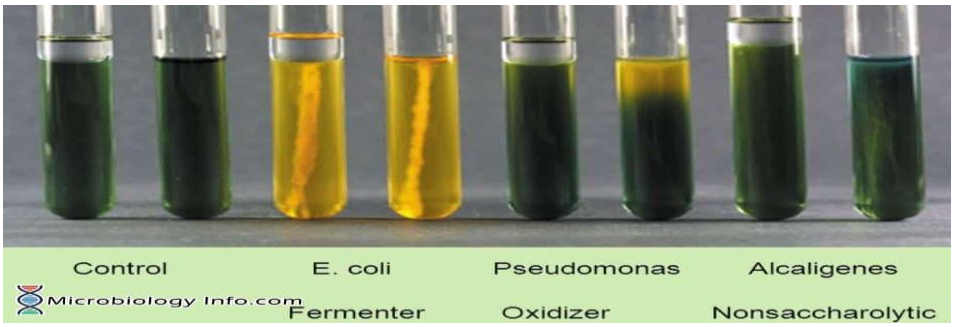
المشاهدة:-

١-ظهور لون اصفر في انبوبة الاكسدة والتخمر

٢- ظهور لون ازرق غامق في انبوبة الاكسدة ولون اصفر في انبوبة التخمر

٣-ظهور لون ازرق غامق في انبوبة الاكسدة والتخمر

٤- ظهور لون اصفر في انبوبة الاكسدة ولون ازرق غامق في انبوبة التخمر



التعليق في الحالة الاولي:-

١- ظهور لون اصفر في انبوبة الاكسدة يوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة لي افراز انزيمات الاكسدة في وجود الاكسجين وتحول الجلوكوز علي ماء وغاز ثاني اكسيد الكربون الذي يتحدو مع بعض ةيكون حمض الكربونيك ودليل ازرق البروموثيمول اصفر في الوسط الحامضي طبقا للمعادلة:-

$H_2CO_3 \leftarrow CO_2 + H_2O \leftarrow$ انزيمات الاكسدة +Glucose

٢- ظهور لون اصفر في انبوبة التخمريوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة لي افراز انزيمات التخمرفي وجود او غياب الاكسجين وتحول الجلوكوز علي حمض الجلوكونيك ودليل ازرق البروموثيمول اصفر في الوسط الحامضي

Gluconic acid ← انزيمات تخمر +Glucose

وتسمي هذة السلالة البكتيرية موكسدة مخمرة

التعليق الحالة الثانية:-

١- ظهور لون ازرق غامق في انبوبة الاكسدة يوضح ان السلالة البكتيرية ليس لها القدرة لي افراز انزيمات الاكسدة في وجود الاكسجين لذلك يكون الوسط الغذائي قاعدي ودليل ازرق البروموثيمول في الوسط القاعدي ازرق غامق

٢- ظهور لون اصفر في انبوبة التخمريوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة لي افراز انزيمات التخمرفي وجود او غياب الاكسجين وتحول الجلوكوز علي حمض الجلوكونيك ودليل ازرق

البروموثيمول اصفر في الوسط الحامضي

Glucose ا+نزيمات تخمر← Gluconic acid

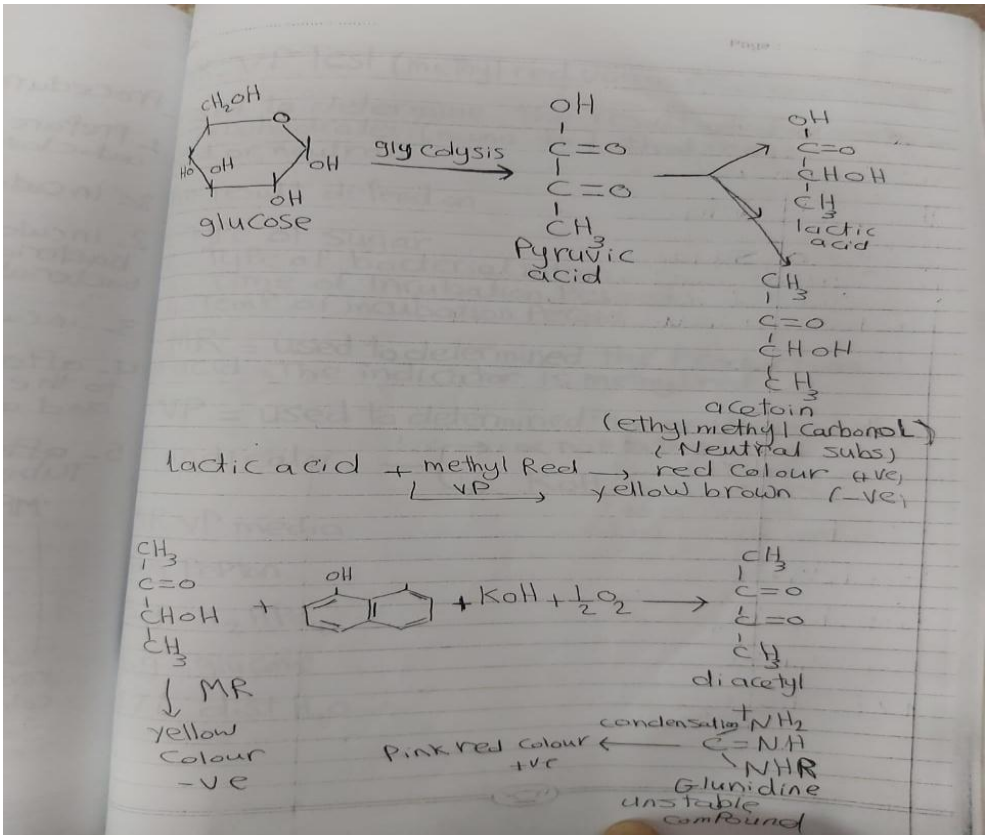
وتسمي هذة السلالة البكتيرية غيرموكسدة مخمرة

MR-VP test) methyl red –vogues prasker test)

يستخدم في معرفة ناتج عملية تخمر المواد الكربوهيدراتة (الاحادية –الثنائية) يكون حامضي او متعادل

MR يستخدم في معرفة اذا كان ناتج التخمر حامضي الدليل المستخدم هو احمر امثيل

VP يستخدم في معرفة اذا كان ناتج التخمر متعادل الدليل المستخدم الفا نافثول وهيدروكسد البوتاسيوم



الخطوات

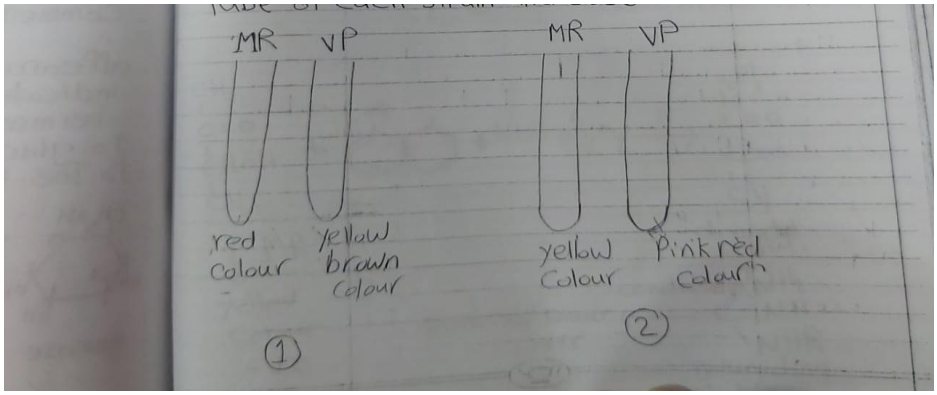
١-نحضر انابيب اختبار مع تعقيها في المعقم

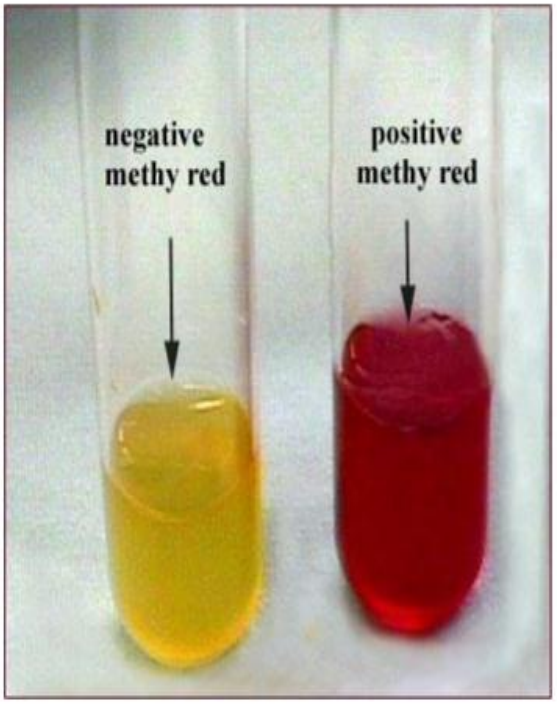
٢-نلقح كل انبوبتين اختبار بنفس السلالة البكتيرية ونلقح بسلالات بكتيرية مختلفة

٣-نحضن الانابب في الحضان لمدة ٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣٧ سليزية

٤-بعد فترة التحضين نضيف دليل احمر الميثيل في الانبوبة الاولي من كل سلالة بكتيرية

في الانبوبة الثانية من كل سلالة بكتيريه نضيف دليل VP

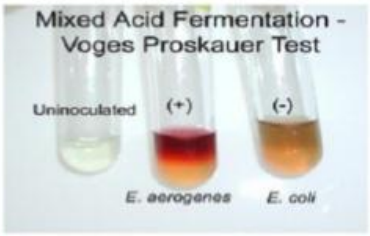


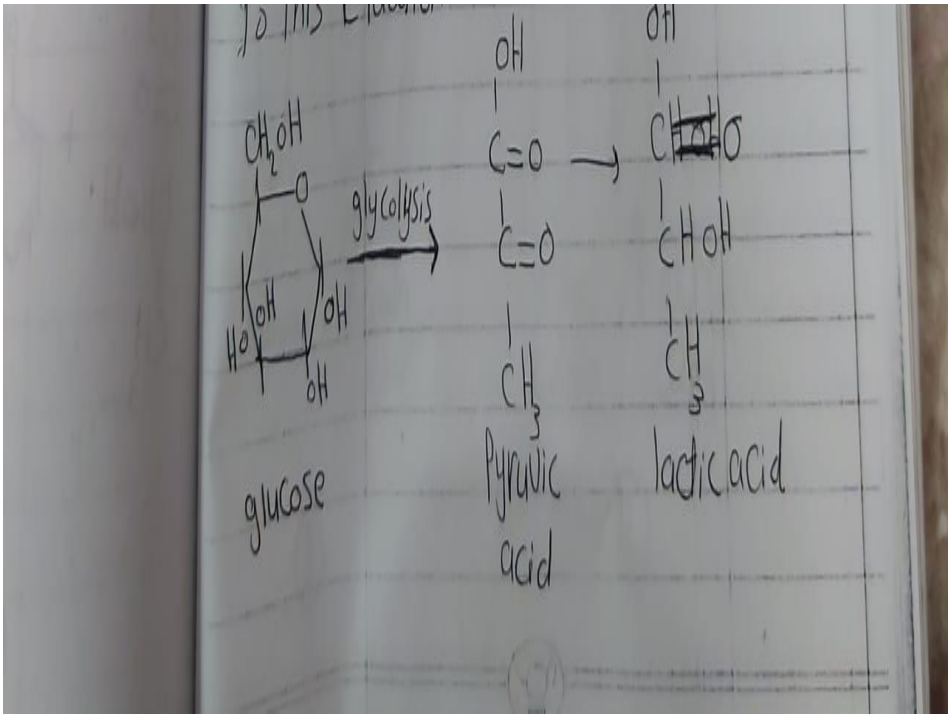


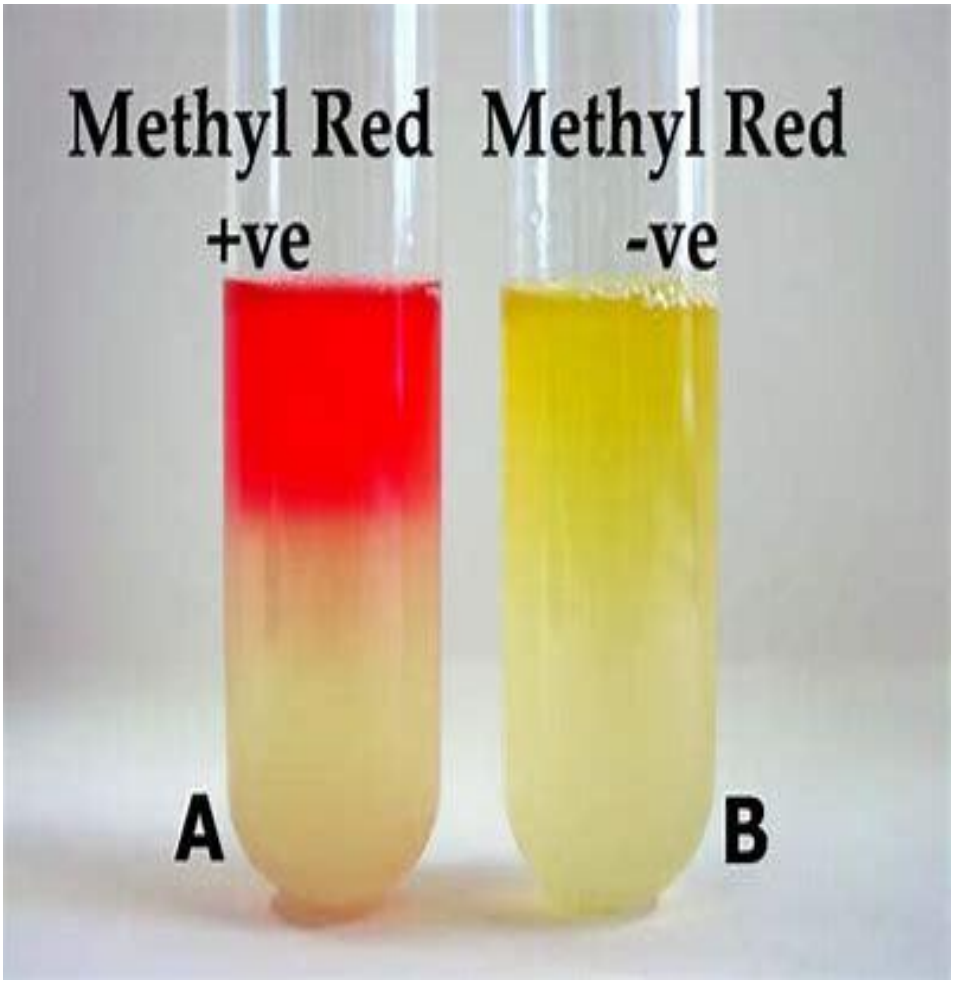
لون الأحمر في الأنبوبة على جهة اليمين(التفاعل موجب)
لون أصفر في الأنبوبة على جهة اليسار(التفاعل سالب)

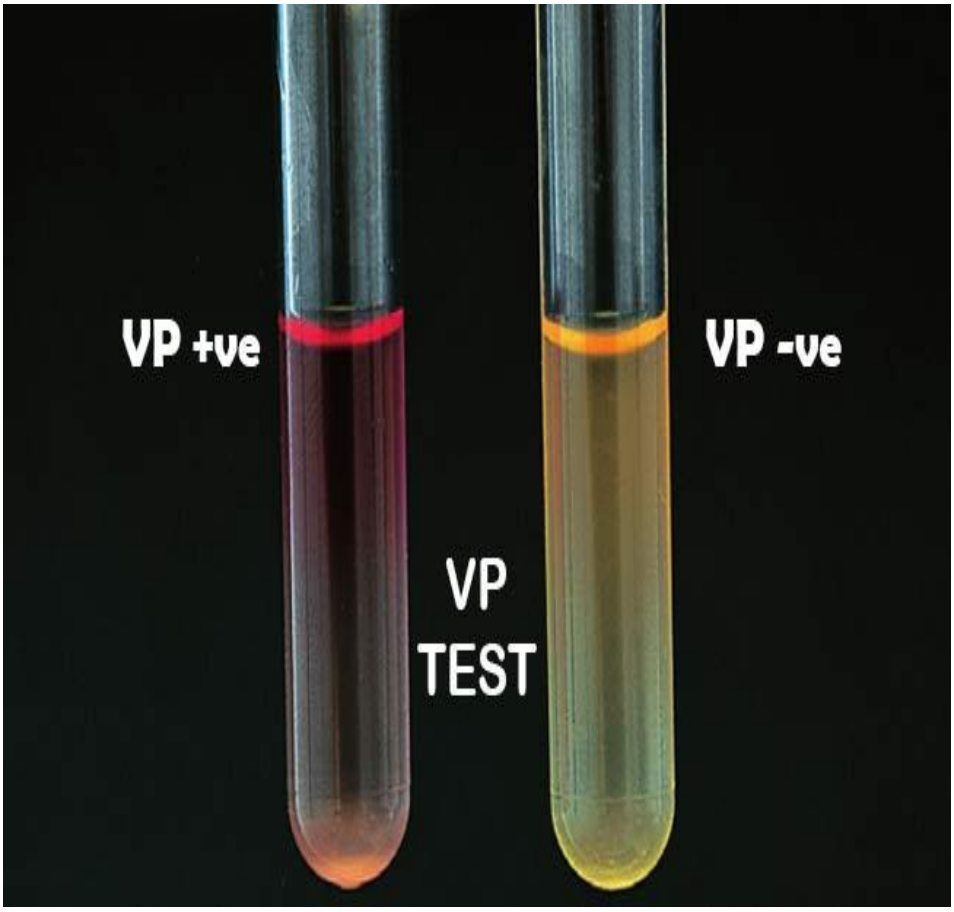
اختبارات احمر الميثيل وفوكس بروسكاور Methyl Red
: (and Voges Proskauer Tests) MR-VP

- هناك أنواع من البكتيريا وخصوصا في عائلة المعوية تخمر سكر الجلوكوز في بيئة النمو MR-VP وينتج عن ذلك تكون أحماض عضوية(حامض اللاكتيك وحمض السكسنيك وحمض الفورميك) .
- وجود تلك الأحماض يؤدي لانخفاض درجة الأس الهيدروجيني إلى 4.5
- وعند إضافة محلول إحمر الميثيل يتحول اللون إلى لون أحمر مما يدل علي إنتاج هذه الاحماض .






Methyl Red
+ve
Methyl Red
-ve
A
B



هدم المواد البروتينية

البروتينات:- عبارة عن مواد معقدة تتكون من العديد من عديدات الببتيد التي تتكون من العديد من الاحماض الامينية التي ترتبط مع بعضها البعض بواسطه روابط ببيتدية .

تختلف انواع البروتينات طبقا لاختلاف مجموعة الحمض الاميني .

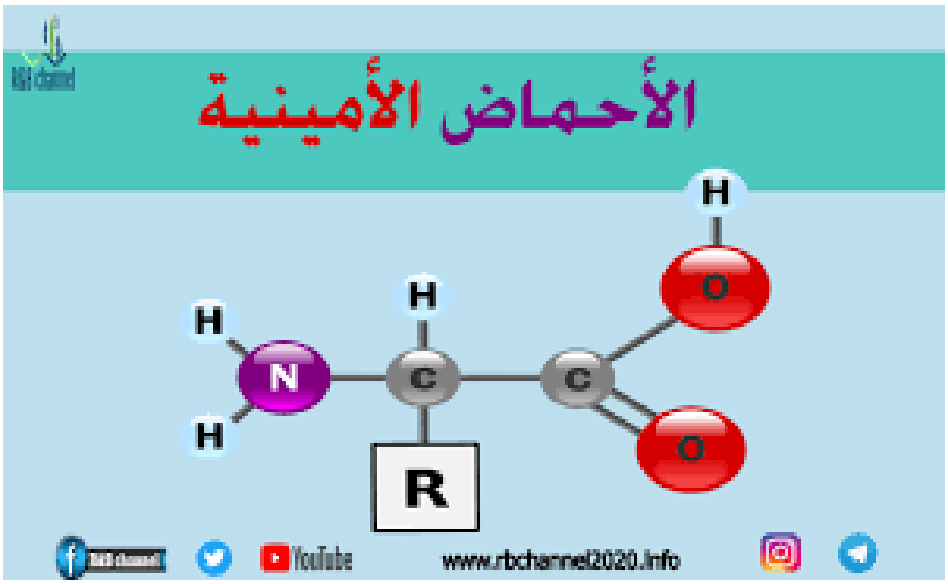
يوجد ٢٠ حمض اميني لهم نفس التركيب مع اختلاف مجموعة R

R-CH-COOH

NH2

COOH عبارة عن مجموعة الكربوكسيل

NH2 عبارة عن مجموعة الامين



١-CH2-COOH

NH2

- Glycin R=H

٢-CH3-CH-COOH

NH2

- alanin R=CH3

٣-SH-CH2-CH-COOH

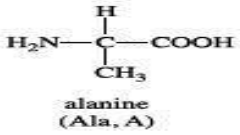
NH2

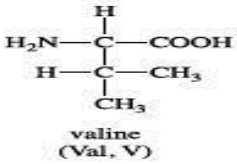
- R=SH-CH2 cystein

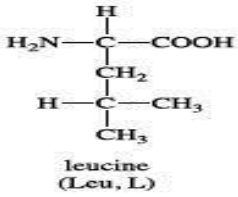
٤-R-CH-COOH

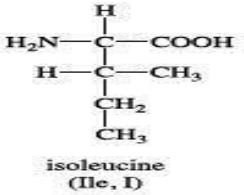
NH2

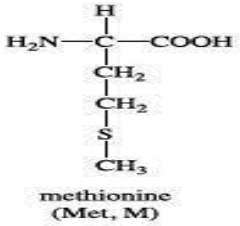
- R= CH2 phenyl alanin

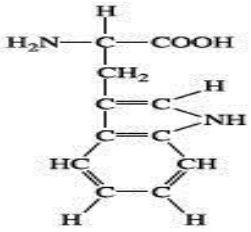


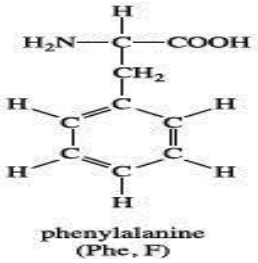


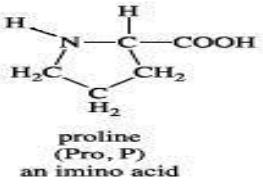












هدم المواد البروتنية:-

١- التحلل المائي للجيلاتين:-

أ- $Hgcl_2$ test

ب- اسالة اجيلاتين

٢-هدم الاحماض الامينية

أ- نزع وتكوين الامونيا

ب-اختبار الاندول

اولا التحلل المائي للجيلاتين:-

$HgCL_2$ test

الخطوات:-

١-نحضر الوسط الغذائي N.A Gelatin media

٢- نعقم الوسط الغذائي في المعقم

٣- نصب الوسط الغذائي في اطباق بتري ونتركه يتصلب في درجة حرارة الغرفة

٤- نلقح الاطباق بسلالات بكتيرية مختلفة

٥- نحضن الاطباق في الحضان عند درجة حرارة ٣٧ لمد ٤٨ ساعة

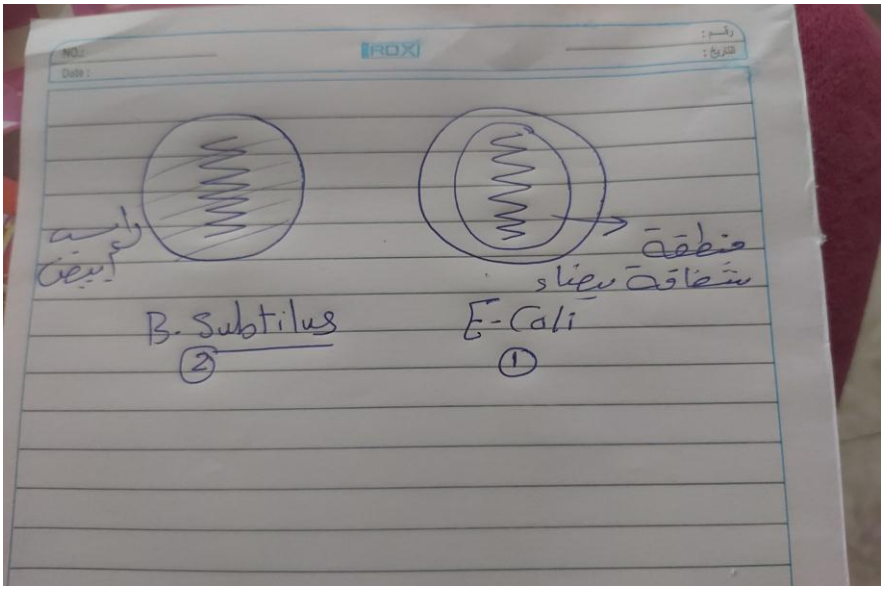
٦- بعد فترة التحضين نغطي الاطاق ب $HgCL_2$

٧- نزيل الكمية الزيادة من $HgCL_2$

المشاهدة

١- ظهور منطقة بيضاء شفاهة

٢- ظهور راسب ابيض



التعليق:-

١- ظهور منطقة بيضاء يوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة علي افراز انزيم جيلاتينيز الذي يحدث تحلل مائي للجيلاتين الي الحمض الاميني طبقا للمعادلة:-

Gelatin + gelatinize → amine acid

لذلك عند اضافة كلوريد الزئبقك لايتفاعل مع الحمض الاميني ويتكون منطقة بيضاء شفافة وهذا يوضع ان السلالة البكتيرية استخدمت الجيلاتين في عملية التغذية

٢-ظهورراسب ابيض يوضح ان السلالة البكتيرية ليس لها القدرة علي افراز انزيم جيلاتينيز لذلك لم يحدث تحلل مائي للجيلاتين لذلك عند اضافة كلوريد الزئبقك تفاعل مع الجيلاتين ويتكون راسب ابيض وهذا يوضع ان السلالة البكتيرية لم تستخدم الجيلاتين في

عملية التغذية

Gelatin+ HgCL2 → white ppt

ثانيا هدم الاحماض الامينية :-

أ- نزع وتكوين الامونيا:-

هذا الاختبار يساعد في الكشف عن وجود الامونيا ومعرفة تحلل الحمض الاميني

الخطوات:-

١- نحضر الوسط الغذائى N broth media في انابيب اختبار وتعقيمها في المعقم

٢- نلقح الانابيب بسلالات بكتيريه مختلفة بحيث كل انبوبين بنفس السلالة البكتيرية

٣- نحضن الانابيب في الحضان عند درجة حرارة ٣٧ لمدة ٤٨ ساعة

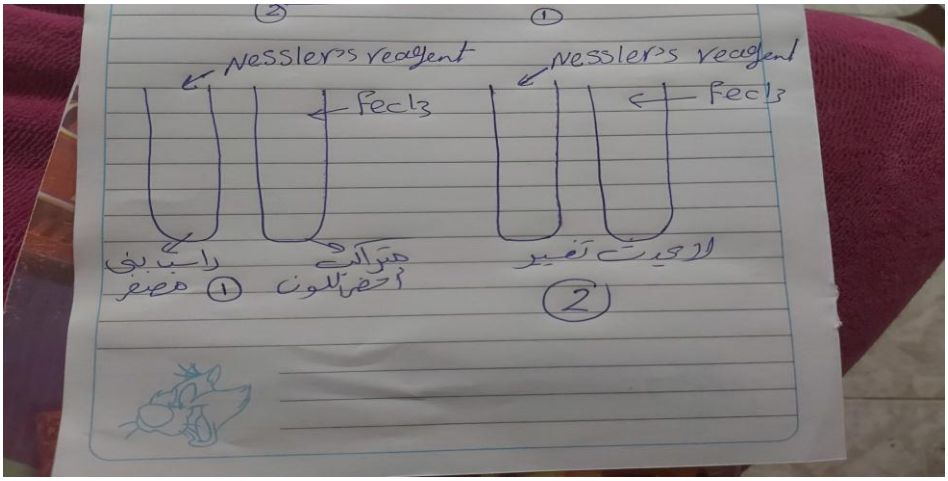
٤- نضع في الانبوبة الاولي ممن كل سلالة بكتيرية كاشف نسلر والانبوبة الثانية من كل سلالة كلوريد الحديديك

المشاهدة :-

١- ظهور راسب بني ولون اصفر في الانبوبة ١ عند اضافة كاشف نسلر

وظهورمتراكب لونة اخضر في الانبوبة ٢ من السلالة الاولي عند اضافة كلوريد الحديدك

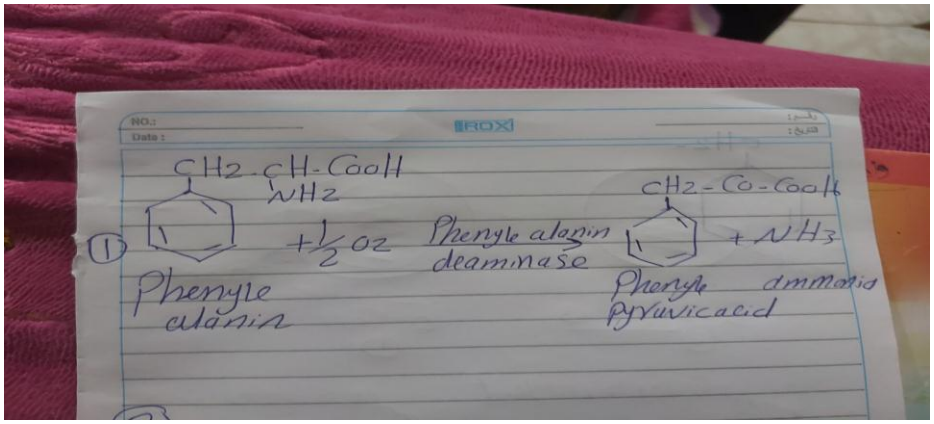
٢- لا يحدث تغيرفي الانبوبة ١و ٢ من السلالة الثانية عند اضافة الكواشف



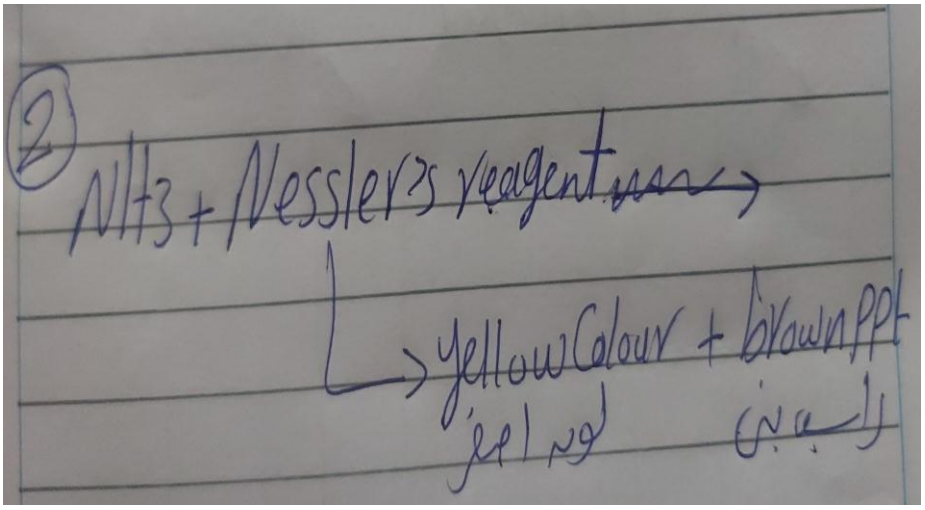
التعليق

١- في حالة السلالة البكتيرية الاولي

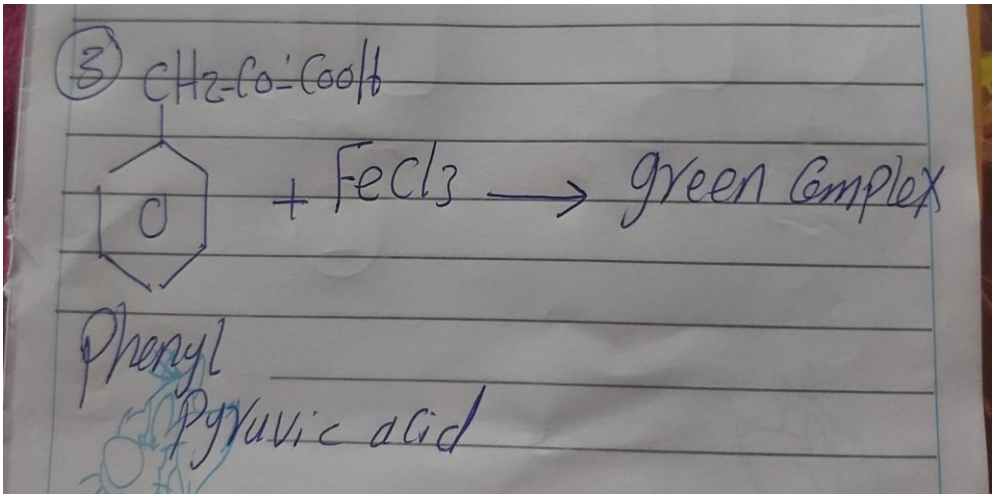
- ظهور راسب بني ولون اصفر عند اضافة كاشف نسلر يوضح ان السلالة البكتيرية لها القدرة علي افراز انزيم فينيل الانين دي امينيز الذي يحدث تحلل مائي للفنيل الانين الي الامونيا وحمض فينيل البيروفيك طبقا للمعادلة:-



لذلك عند اضافة كاشف نسلر يتفاعل مع الامونيا ويتكون راسب بني مصفر طبقا للمعادله :



ظهور متراكب اخضر عند اضافة كلوريد الحديدك نتيجة لتفاعلة مع حمض الفنيل البيروفيك طبقا للمعادلة :



وهذا يوضح ان هذه السلالة البكتيرية استخدمت حمض فنيل الانين في عملية التغذية

٢- في حالة السلالة البكتيرية الثانية:-

لا يحدث تغيرفي الانبوبة ١و ٢ من السلالة الثانية عند اضافة كلوريد الحديدك وكاشف نسلر يوضح ان السلالة البكتيرية ليس لها القدرة علي افراز انزيم فينيل الانين دي امينيز لذلك لم يحدث تحلل مائي للفنيل الانين الي الامونيا وحمض فينيل البيروفيك وهذا يوضح ان هذه السلالة البكتيرية لم تستخدم حمض فنيل الانين في عملية التغذية.

اختبار الاندول:

هو اختبار يوضح قدرة بعض البكتيريا على تحلل الحمض الأميني التربتوفان للإندول، ويتم ذلك من خلال سلسلة من الإنزيمات المختلفة داخل الخلايا التي تعمل على تفكيك الحمض الأميني التربتوفان مع إطلاق الإندول.

ما الهدف من إجراء اختبارIndole ؟

لتحديد قدرة الكائن الحي على إنتاج الإندول بفعل إنزيم التربتوفاناز، وأيضاً يتم استخدام هذا الاختبار للتميز بين أنواع عائلة البكتيريا المعوية ومن بينها:

١. للتميز بين أنواع بكتيريا.*Proteus*

٢. للتمييز بين أنواع بكتيريا.*Klebssiella*

٣. للتمييز بين أنواع بكتيريا.*Citrobacter*

ما هو مبدأ عمل اختبار Indole؟

البكتيريا التي تنتج إنزيم التربتوفاناز قادرة على تحلل الحمض الأميني التربتوفان إلى الإندول، يتم الكشف عن الإندول عن طريق إضافة كاشف .Kovacويتم إجراء هذا الاختبار عن طريق زراعة عينة من البكتيريا المعزولة في أنبوب اختبار يحتوي على وسط غذائي من التربتوفان، ومن ثم احتضان أنبوب الاختبار على درجة حرارة ٣٧ لمدة ٢٤ ساعة وبعد انتهاء المدة إضافة كاشف .Kovac

طريقة العمل:

١- ماء ببتون + ١% تربتوفان

٢- يلقح الوسط بالبكتريا ويحضن لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مئوية ثم يضاف له الكاشف Kovac's reagent علي السطح الداخلي للانبوبة

كيف يتم تفسير نتائج اختبارIndole ؟

النتيجة الإيجابية :بعد إضافة الكاشف تتشكل حلقة حمراء أعلى الأنبوب.

النتيجة السلبية :عدم تغير أي لون في الأنبوب بعد إضافة الكاشف.

الجزء العملى الخاص بالفطريات

Kingdom: Mycophyta

Division (1): Myxomycophyta

Division (2): Eumycophyta

تنقسم الفطريات الحقيقه الى

	Class(1) Phycomycetes Zygomycetes	**Class(2) Ascomycetes**	**Class(3) Basidiomycetes**	**Class(4) Deutromycetes**
Mycelium	Aseptate	Septate	Septate	Septate
Asexual spores	Zoospores Sporangiospores	Conidia	Conidia	Conidia
Sexual spores	zygospores	Ascospores	Basidiospores	Absent

الفطريات الزيجوتيه (الطحلبيه)

Kingdom : Mycophyta

Division : Eumycophyta

Class (1): Phycomycetes

Subclass: Zygomycetes

Order : Mucorales

Family(1): Mucoraceae

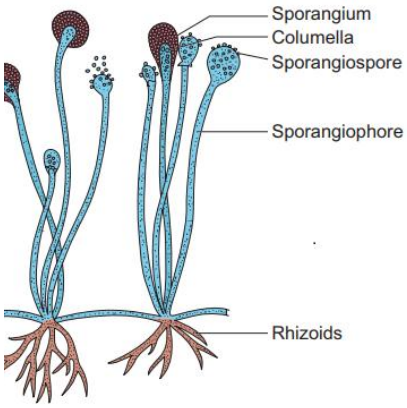
e.g : *Rhizopus* sp.

e.g: *Mucor* sp.

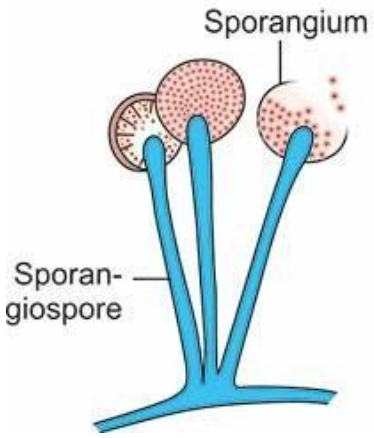
e.g : *Circinella* sp.

Family(2): Cephalidiaceae

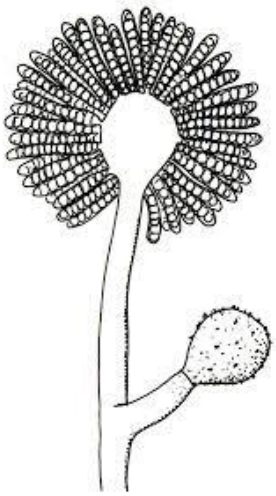
e.g: *Syncephalastrum* sp.



Rhizopus sp.



Mucor sp.



Syncephalastrum sp.

Circinella sp.

الفطريات الزقيه

Kingdom: Mycophyta

Division: Eumycophyta

Class(2): Ascomycetes

Subclass: Euascomycetes

Order : Aspergillales

Family: Aspergillaceae

e.g : *Aspergillus* sp.

e.g: *Penicillium* sp.

الصفات العامه لفطر الاسبيرجيلس

١- لون المستعمره (Colony color)

٢- خلفيه المستعمره (Colony reverse)

٣- الحويصله (Vesicle)

٤- الذنيبات (Stregmata)

٥- الراس الكونيديه (Conidial head)

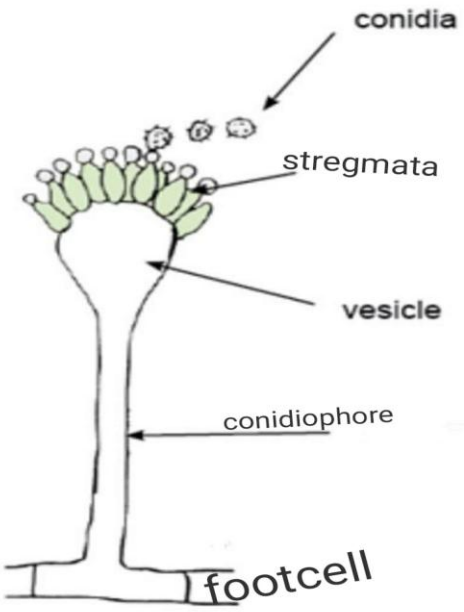
٦- الحامل الكونيدى (Conidiophore)

٧- الكونيدات (Conidia).

٨- الجراثيم الزقيه (Ascospore)

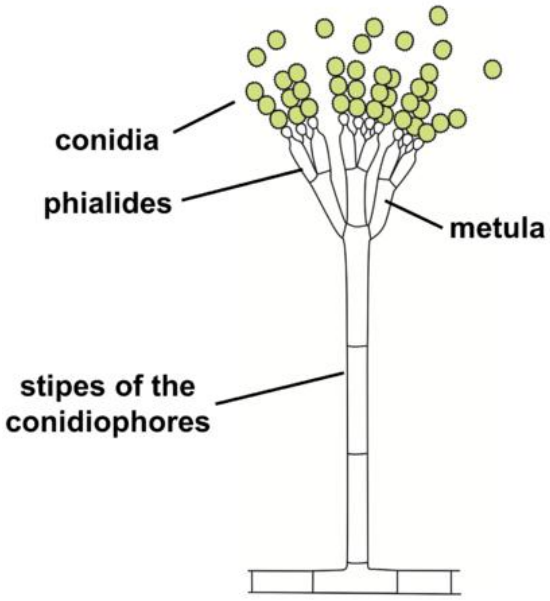
٩- خلايا الهيول (Hull cell).

١٠- الاجسام الحجريه (Sclerotia).



الصفات العامه لفطر البنيسيليوم

1- Colony color
2- Colony reverse
3- Matullae: Absent or present
4- Pencilli: Monoverticillata or Biverticillata (Symmetric or Asymmetric)
5- Conidiophore: long or short/smooth or rough/ piment or hyaline/ branched or unbranched.
6- Conidia: Globose or sub or ovate/hyaline or pigment/smooth or rough
7- Ascospore: Present or absent
8- Hull cell: Present or absent
9- Sclerotia: Present or absent



الفطريات الناقصه

Kingdom: Mycophyta

Division : Eumycophyta

Class(4): Deutromycetes

Order : Moniliales

Family (1): Dematiaceae

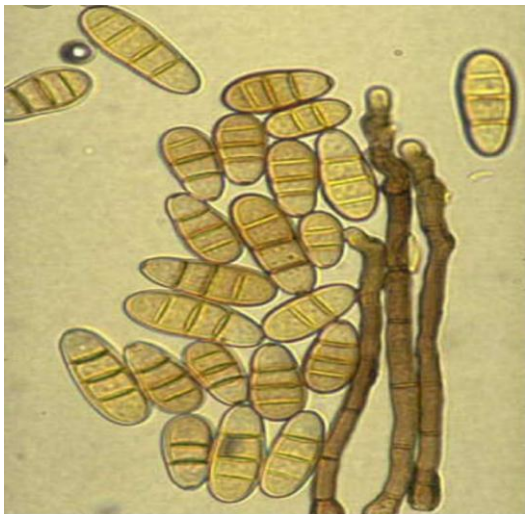
e.g. **:***Drechslera* sp.

:*Curvularia* sp.

:*Alternaria* sp.

:*Ulocladium* sp.

:*Cladosporium* sp.

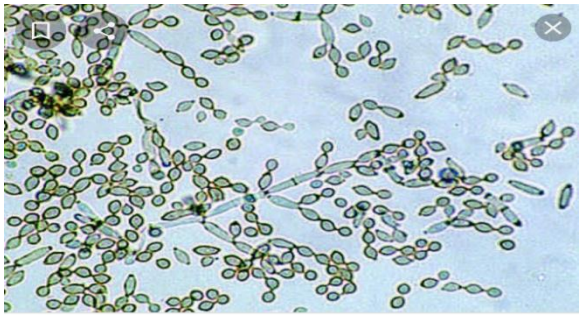


Drechslera sp.

Curvularia sp.

Alternaria sp.

Ulocladium sp.



Cladosporium sp.

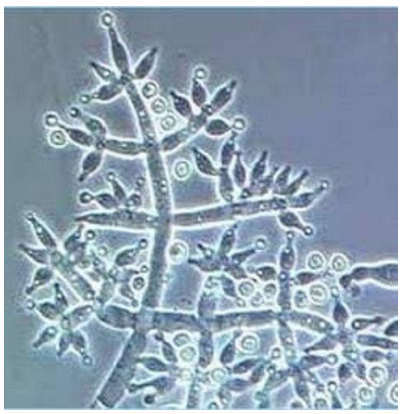
Order: Moniliales

Family (2): Moniliaceae

e.g: *Scopularioposis* sp.

Trichoderma sp.

Scopularioposis sp.



Trichoderma sp.

Family (3): Tuberculariaceae

e.g. : *Fusarium* sp.

Fusarium sp.

المراجع:

حسين العروسي، عماد الدين وصفي، المملكه النباتيه. مكتبة المعارف الحديثة (٢٠٠٥).

حسوني جدوع عبد الله، ، صبا رياض خضير، اشرف سامي حسن، البيئة، بيئة الحيوان والنبات والاحياء المجهرية، دار دجلة عمان، (٢٠١٥).

محمد علي أحمد أحمد، قاموس المصطلحات الفطرية، المكتبة الأكاديمية (٢٠٠٠).

عبد العزيز نخيلان، اساسيات علم الفطريات، دار دجله للنشر (٢٠٠٩).