تجربة عزل البكتيريا الممرضة من المياه

يعتبر الماء وسط مثالي لنقل ونشر البكتيريا الممرضة ومن أبرزها :

Salmonella typhi

Shigella

Vibrio cholera - Vibrio parahaemolyticus

طريقة العزل:

1- جمع عينة الماء الملوثة (100 مل) باستعمال قنينة زجاجية معقمة بثلاثة مكررات.
2- زرع 1 مل من العينة بطريقة الصب في أوساط زرعيه انتخابية Selective media خاصة بالاجناس البكتيرية حيث يستخدم وسط Salmonella Shigella agar (SS agar) و XLD agar لعزل كلا من بكتيريا السالمونيلا والشيگيلا.
3- كذلك يزرع 1 مل من العينة اعلاه في الوسط الخاص بعزل بكتيريا الكوليرا

Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (TCBS agar)

4- بنفس الخطوة يتم اجراء تقنية الترشيح عبر الاغشية MFT لعينة الماء المتبقية وذلك لضمان الحصول على البكتريا من الماء في حال عدم إمكانية العزل بالزرع المباشر اعلاه.
5- توضع المرشحات على سطح الأوساط الانتخابية أعلاه بالإضافة على وسط ماكوكي اكار.
6- حضن العينات بدرجة حرارة 37 º مئوية لمدة 24-48 ساعة ونلاحظ النتائج.

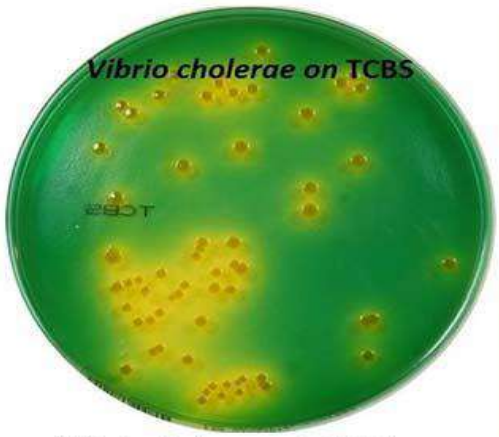
نتائج الزرع على وسط SS agar

- بكتيريا Salmonella تظهر على شكل مستعمرات منتظمة سوداء اللون محاطة بهالة شفافة

- بكتريا Shigellaتظهر على شكل مستعمرات منتظمة شفافة
- على نفس الوسط أعلاه تنمو بكتريا ال E. coli بشكل مستعمرات وردية

Escherichia coli *Salmonella* *Shigella*

- اما بكتريا الكوليرا تظهر بشكل مستعمرات صفراء كبيرة وغامقة متميزة عن مستعمرات Vibrio parahaemolyticus والتي تكون خضراء مزرقة .



***Vibrio cholerae* on TCBS Agar**

***Vibrio parahaemolyticus* on TCBS Agar**

- بعد التشخيص اعلاه يتم تحضير مسحة وتفحص تحت المجهر الضوئي

تجربة عزل بكتريا التربة
Soil bacteria isolation

تحتل البكتيريا كمجموعة رئيسية من كائنات التربة مكانا بارزا ، فهي أكثر المجموعات تواجدا في التربة وتتفوق عددا على باقي المجاميع مجتمعة.

الخلية البكتيرية المفردة صغيرة في الحجم حيث نادرا ما يتجاوز طولها عدة مايكرونات.من المعروف أن سيادة نوع من الأحياء تتحدد تبعا للظروف البيئية السائدة ،فالبكتيريا والفطريات تصبح سائدة في التربة عندما تتوفر ظروف تهوية مناسبة ، أما في حالة نقص الأوكسجين فان البكتيريا تكون هي المسئولة عن التغيرات الحيوية والكيميائية دون الاعفان.

تتميز البكتيريا عن باقي المجاميع التي تشترك معها في نفس العمليات الحيوية في التربة بسرعة تكاثرها وقدرتها الفائقة على تحليل أنواع كثيرة من المواد الطبيعية.

يمكن تقسيم بكتيريا التربة إلى قسمين رئيسيين:

أ- البكتيريا المتأصلة في الموطن (Indigenous) :-

وهي التي تستوطن التربة بصورة طبيعية ودائمة وتساهم بفعالية في النشاطات الكيميائية الحيوية فيها. وتتميز بقدرتها على مقاومة الظروف غير المناسبة لفترات طويلة وبسرعة استجابتها لإضافة العناصر المغذية العضوية.

ب- البكتيريا الدخيلة على التربة (Invaders):-

وهي التي تصل التربة مع الأمطار أو الأنسجة المريضة أو مخلفات الإنسان والحيوان. هذه الأنواع تظل حية لفترات قصيرة ولا تشارك بفعالية في عملية تحويل العناصر في التربة،كما لا تشارك في اي نوع من العلاقات مع غيرها من كائنات التربة.

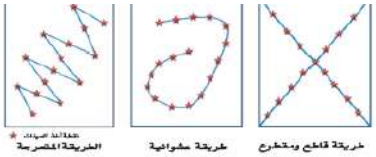
وهناك أنظمه أخرى للتقسيم مثل الحاجة إلى الأوكسجين أو شكل الخلية البكتيرية .....الخ.

يعتبر تقدير أعداد البكتيريا في التربة من الأمور المعقدة لأسباب كثيرة،منها عدم وجود وسط مثالي لتنمية جميع الأنواع اظافة إلى أن بعض الأنواع لم تحدد متطلباتها تحديدا دقيقا.

كذلك فأن الخلايا البكتيرية عادة ما توجد في التربة على هيئة تجمعات يصعب تفتيتها بصورة متجانسة أثناء عملية الرج أو الزرع مما يؤثر على التقدير الكمي لها.

كيـــف تتم عملية أخذ عينات التربة؟

1. تحديد المناطق المتجانسة [1] في نفس الحقل
2. أخذ خمسة عشر عينة في كل منطقة متجانسة حسب إحدى الطرق الثلاث لأخذ عينات التربة كما هو مبين بالصورة المرافقة :



[1] المناطق المتجانسة يمكن تعريفها بأنها مناطق تتميز بنقاط مشتركة تتمثل خصوصا في نوع التربة (اللون والهيكلة والقوام...) ونفس الطوبوغرافيا ونفس السابق الزراعي و منظومة تصريف المياه وعليها نفس الزراعة من حيث مرحلة النمو وسابقها الزراعي و نظام الري ونوعية مياهه

من أين تأخذ العينات؟

-الحرص على أخذ العينات من المناطق الأكثر تجانسا (اللون والنوع و العمق والسابق الزراعي...)
-تفادي حواشي الحقول
-الابتعاد عن ضفاف مجاري المياه والأودية و الطرقات والمسالك الفلاحية

ظروف أخذ عينات:

يتطلب إنجاح عملية أخذ عينات التربة ما يلي:
استعمال معدات نظيفة تم غسلها بالماء جيدا
تنظيف المثقب جيدا من كل التربة العالقة به قبل أخذ العينة الموالية
تنظيف المعدات قبل الانتقال من موقع إلى آخر (أنواع تربة مختلفة)

المعدّات الضرورية:

-أكياس بلاستيكية و رموز للعينات
-مثقب (من المستحسن بعرض 5سم) ومسبار و مجرفة
-أوعية وأواني بلاستيكية لخلط العينات الموضعية
-مناديل ورقية
-قفازات
-أقلام الحبر الثابت
-أكياس احتياطية
-فرشاة لتنظيف الأواني

كيفية استخدام المثقب اليدوي:

مجرفة — مسبار — مثقب يدوي (إدلمان)

يتم أخذ عينة التربة باستخدام المثقب اليدوي وذلك بغرز المثقب بطريقة دوارنية في التربة في اتجاه عقارب الساعة

تجميع العينات الخمسة عشر في إناء بلاستيكي

-خلط العينات الموضعية وجعلها متجانسة قدر الامكان قصد الحصول على عينة مركبة، جامعة وممثلة للحقل المعني
-أخذ كمية تتراوح من 0.5 كغ إلى 1 كغ من العينة المركبة في كيس بلاستيكي يحمل رمز العينة
تجنب استعمال أكياس الأسمدة أو المبيدات و أكياس مواد التنظيف

عينة مكررة:

العينة المكررة هي عينة ثانية يتم أخذها من العينة المركبة و المتجانسة قصد ضمان جودة العملية وتمكن من تحديد موثوقية عملية التحليل (في صورة تحليل العينتين في نفس المخبر أو مخبر آخر) وعليه لابد أن تكون العينة المكررة مطابقة قدر الامكان للعينة الأصلية وترسل العينتين (الأصلية والمكررة) إلى المخبر برمزين مختلفين.

https://www.youtube.com/watch?v=_ld4ljZRNTI

الغرض من التجربة:

عزل وعد وتشخيص الأنواع البكتيرية الموجودة في عينة التربة ودراسة صفاتها المظهرية.

المواد المستخدمة:

1. يستخدم الوسط (Soil Extract Agar) أو وسط الاكار المغذي كبديل في حالة عدم توفر الاول.
2. أنابيب اختبار، ماء مقطر معقم ، حمام مائي، اطباق زجاجية معقمة، بصبغة كرام،صبغة malachite green.

طريقة العمل:

1. يوزن (1 غم) من كل نموذج من النماذج المختلفة (تربة زراعية وتربة رملية) ويضاف إلى أنابيب اختبار حاوية على (9 مل) من الماء المقطر المعقم بذلك يتم الحصول على تخفيف 10/1 ثم تعمل التخافيف التالية 100/1 و 1000/1 (ثلاث مكررات لكل تخفيف).
2. في حالة عزل البكتريا الهوائية والمكونة للابواغ توضع أنابيب التخافيف في حمام مائي عند درجة حرارة (80°م) لمدة 20 دقيقة لقتل الخلايا الخضرية الغير مكونه للابواغ وضمان الحصول على الابواغ التي تستطيع البقاء حية عند هذه الدرجة ضمن تلك المدة.
3. تنقل كميه (1.0-1 مل) من كل أنبوب إلى طبق زجاجي معقم ثم يصب الوسط الغذائي (درجة حرارة الوسط 50°م) تخلط العينة مع الوسط بتحريك محتويات الطبق أفقيا باتجاه وعكس عقارب الساعة مباشرة بعد صب الوسط ثم يترك ليتصلب.
4. تحضن الأطباق في حاضنة بدرجة (30°م) مدة أسبوع واحد.
5. تلاحظ المستعمرات وتعد ثم تعمل مسحه من تلك المستعمرات وتصبغ بصبغة الابواغ أو بصبغة كرام. تلاحظ الخلايا الخضرية والخلايا المكونة للابواغ وكذلك موقع البوغ في الخلية.
6. لحساب العدد الكلي للبكتريا؛ تعد المستعمرات البكتيرية في كل طبق ويسجل معدل المستعمرات لمكررات كل تخفيف (المكررات ثلاث). تهمل الأطباق التي تحوي عدد مستعمرات اقل من 30 وأكثر من 300.
7. تسجل النتائج وينظم جدول لهذا الغرض معدل عدد المستعمرات المقابله لكل تخفيف وتدون مجموعة الأحياء المجهريه ثم يحسب عدد الخلايا في 1 غم من التربه الجافة بتطبيق القانون التالي:

عدد الخلايا في 1 غم = عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

عزل البكتيريا الخيطية Streptomyces من التربة

تعتبر بكتريا ستربتومايسس من الاجناس البكتيرية المنتجة للمضادات الحياتية والتي تعزل بشكل مباشر من التربة ولغرض الوقوف على كيفه الحصول عليها واختبار قابليتها على انتاج المضادات الحياتية نقوم باتباع الخطوات التالية

جمع عينات التربة :Soil sampling

1- تؤخذ العينة باستعمال ملعقة نظيفة بعد قشط (1) سم من سطح التربة وبعمق يتراوح بين (5-10) سم.
2- كمية العينة المأخوذة نحو(500)غم.
3- توضع في كيس معقم وتسجل عليه كافة المعلومات.
4- تنقل الاكياس الى المختبر لأجراء الدراسات عليها.
5- في حال عدم امكانية فحصها مباشرة بنفس اليوم تحفظ في الثلاجة.

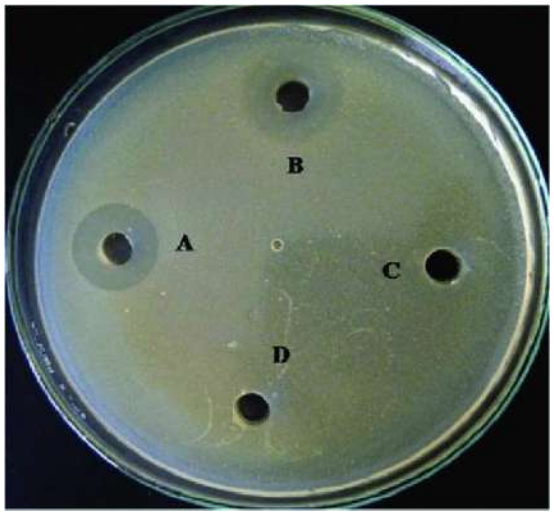
وهناك عدة تقنيات لعزل وانتخاب السلالات البكتيرية المهمة في انتاج المضادات الحيوية وعوامل النمو كالفيتامينات والاحماض الامينية وغيرها، ومن اهم تلك التقنيات هي :

تقنية الطبق المزدحم Crowded plate technique

تستخدم لعزل البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية وكذلك لعزل البكتريا المنتجة لبعض عوامل النمو. وتجرى كما يلي :

1- يعلق Suspend 1غم من نموذج التربة في 10 مل من الماء المقطر المعقم ويمزج جيدا ثم يترك لتترسب التربة.
2- تعمل سلسلة تخافيف عشرية لراشح التربة (10^{-6}) .
3- ينشر 0.1 مل من التخفيف العشرية على اطباق nutrient agar.
4- تحضن الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 48-24 ساعة.
5- تفحص الاطباق خلال مدة الحضن وتنتخب المستعمرات التي تظهر حولها منطقة خالية من النمو.
6- تؤخذ المستعمرات المنتخبة ويعمل منها عالق بكتيري باستعمال محلول ملحي Normal saline
7- كما يحضر عالق بكتيري من مزارع بكتيرية ممرضة معزولة من مصادر أخرى غير التربة لفحص فعالية البكتريا المعزولة من التربة ضد هذه العزلات الممرضة حيث ينشر 0.1 مل من مزارع لعزلات بكتيرية مرضية على اطباق Mueller Hinton agar بطريقة النشر Spreading باستعمال الناشر الزجاجي.
8- تعمل 5حفر في الاكار المزروع عليه بكتريا ممرضة بواسطة Cork borer معقم.

9- يوضع 0.1 مل من عالق البكتريا المعزولة من التربة (المنتجة للمضادات على سبيل الافتراض) في الحفر، ثم تحضن الاطباق بدرجة 37°C لمدة 24ساعة.
10- تلاحظ مناطق تثبيط حول الحفر الحاوية على البكتريا المنتجة للمضادات الحيوية والتي تم عزلها من التربة.
11- بعد اثبات قابلية البكتيريا الخيطية على التثبيط يتم تنقيتها وزرعها داخل مفاعلات حيوية Bioreactors لغرض الإنتاج الصناعي للمضادات تمهيدا لتعليبها داخل كبسولات او حبوب او شراب لتكون جاهزة للاستعمال الطبي.



تجربة عزل الجراثيم من الهواء

Isolation of Microbes from air

الغرض من هذه التجربة هو عزل الجراثيم من الهواء الجوي وخصوصا في قاعات وغرف العمليات الجراحية وكذلك الهواء الصادر من أجهزة التكييف والتبريد والمعامل.. الخ بهدف الوقوف على مدى تلوث الهواء في البيئة المحيطة بها لإعطاء تقييم لجودة الهواء:

طريق العمل: الطريقة المتبعة لعزل ميكروبات الهواء تسمى بـ **settle-plate method** وكما يلي

1- قم بتحضير أوساط زرعية صلبة مثل وسط Nutrient agar.
2- اترك غطاء الطب مفتوحا لمدة 5-10 دقائق بعدها اغلق فوهة الطبق.
3- ضع الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة ومن ثم سجل النتائج بعد تشخيصها مظهريا ومجهريا.