

الدرس العملي الأول

اختبار بعض الصفات الأساسية لبكتريا
حامض اللاكتيك

الأجهزة والأدوات

- حضانات كهربائية (Incubators)
- مجهر ضوئي.
- شرائح زجاجية.
- إبر تلقيح (Inoculating loops).
- عدسة مكبرة.

المواد والمزارع الميكروبية

- المحاليل اللازمة للصبغ بطريقة جرام وتشمل محلول صبغة الكريستال البنفسجي ، محلول صبغة السفرانين، محلول اليودين، كحول إيثيلي (٩٥%).
- بيئة أجار اللبن (Milk agar) المحتوية علي دليل البروموكريزول البنفسجي مصبوبة في أطباق بتري.
- بيئة MRS agar الصلبة وبيئة (M17+ agar (0.5% glucose) الصلبة موزعة في دوارق مخروطية (Flasks) وأطباق بتري.

● مزرعة من ميكروب *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* منماة في بيئة MRS agar وعمرها ١٨-٢٤ ساعة.

● مزرعة من ميكروب *S. thermophilus* منماة في بيئة agar (M17 + 0.5% glucose) وعمرها ١٨-٢٤ ساعة.

● مزرعة من ميكروب *Lc. lactis* subsp. *lactis* منماة في بيئة agar (M17 + 0.5% glucose) وعمرها ١٨-٢٤ ساعة.

● مزرعة من ميكروب *Lc. lactis* subsp. *cremoris* منماة في بيئة agar (M17 + 0.5% glucose) وعمرها ١٨-٢٤ ساعة.

دراسة الشكل المورفولوجي لخلايا ومستعمرات بكتريا حامض اللاكتيك:

q قم بأخذ لمسة من كل من المزارع السابق ذكرها ثم أفردتها جيداً علي سطح شريحة زجاجية مضاف إليها بضعة قطرات من الماء لتسهيل نشر اللمسة.

q اترك الشريحة قليلاً لتجف في الهواء ثم قم بتثبيت اللمسة المفرودة (فيلم) بتمريرها في اللهب مرتان أو ثلاث.

q أضف قليلاً من صبغة الكريستال البنفسجي وأتركها لمدة دقيقة ثم اغسل الشريحة بالماء للتخلص من الصبغة الزائدة.

q تترك الشريحة لتجف قليلاً ثم تضاف قطرات من محلول اليودين ويترك لمدة دقيقة ثم تغمر الشريحة بكحول إيثيلي تركيزه ٩٥% وذلك لمدة نصف دقيقة ثم تغسل بالماء.

q تترك الشريحة لتجف ثم يصبغ الفيلم بصبغة السفرانين لمدة نصف دقيقة، ثم تغسل الصبغة بالماء وتجفف الشريحة وتفحص بالعدسة الزيتية للمجهر الضوئي بعد وضع قليل من زيت السيدر أو البرافين عليها.

q لاحظ شكل الخلايا هل هي كرويات أم عصويات؟ هل توجد منفردة أم في تجمعات؟ إذا كانت في تجمعات هل هي منتظمة أم غير منتظمة؟ هل تلاحظ شكل السلاسل؟ هل هناك سلاسل تشبه المسبحة؟ ما لون الخلايا؟ هل هي موجبة أم سالبة لجرام؟

سجل مشاهداتك و ارسم الخلايا كما تراها تحت المجهر في الجدول التالي:

تفاعل جرام	رسم الخلايا	منفردة أم في تجمعات	شكل الخلايا	اسم الميكروب
				<ul style="list-style-type: none">Ø <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>Ø <i>S. thermophilus</i>Ø <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>Ø <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

ثانياً: فحص شكل المستعمرات

- افحص بالعين المجردة أو بمساعدة العدسة المكبرة شكل مستعمرات بكتريا حامض اللاكتيك كما تظهر علي أطباق بتري، هل هي دائرية أم غير منتظمة؟ ما شكل حوافها؟ هل المستعمرات صغيرة، متوسطة، أم كبيرة الحجم؟ هل تنمو علي سطح بيئة الزرع أم منغرسه في الإجار؟

سجل مشاهداتك وارسم المستعمرات كما تراها في الجدول التالي:

رسم المستعمرات	موقع المستعمرات علي بيئة الزرع	حجم المستعمرات	شكل المستعمرات	اسم الميكروب
				<p>Ø <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i></p> <p>Ø <i>S. thermophilus</i></p> <p>Ø <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i></p> <p>Ø <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i></p>

اختبار أنسب الظروف لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك علي بيئات الزرع:

q باستخدام إبرة التلقيح قم بأخذ لمسات صغيرة من كل من المزارع الأربعة السابق ذكرها وذلك لتخطيط ثلاثة مجموعات من أطباق بتري بحيث تتكون المجموعة الأولى من أربعة أطباق من بيئة MRS agar والثانية من أربعة أطباق من بيئة M17+ 0.5% glucose agar والثالثة من أربعة أطباق من بيئة أجار اللبن المحتوي علي دليل البروموكريزول البنفسجي.

● في كل مجموعة من الأطباق يوضع الطبق الأول في الحضان مع التحضين تحت ظروف هوائية علي درجة حرارة مناسبة (٣٠°م للميكروبات المحبة للحرارة المتوسطة مثل *Lc. Lactis subsp. lactis*، 42°م للميكروبات المحبة للحرارة العالية مثل *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*) بينما يوضع الطبق الثاني في حضان آخر علي نفس درجة الحرارة ولكن تحت ظروف لاهوائية (ناقش مع المشرف علي الدرس العملي كيف يمكنك أن تحول ظروف التحضين إلي ظروف لاهوائية بطريقة بسيطة) أما الطبقتين الثالث والرابع فيتم إضافة طبقة منصهرة من نفس بيئة الزرع علي سطح البيئة بعد تخطيطها بالمزرعة (يمكن أن نطلق علي هذه الطبقة إسم "الطبقة المغطية" (Overlay) في كل من الطبقتين.

q تترك لتتصلب وبعدها يوضع أحد الطبقين في الحضان
تحت ظروف هوائية والأخر في حضان آخر تحت ظروف
لاهوائية

q تترك الأطباق للتحضين لمدة ٢-٣ أيام علي درجة الحرارة
المناسبة ثم تحفظ في الثلاجة لحين فحصها في الدرس العملي
التالي.