جامعة دمياط
Damietta University

ميكروبيولوجيا زراعية - عام

إنتشار الميكروبات فى الطبيعة

(لطلاب الفرقة الثانية)

إعداد

د/ شريف محمد القاضى

مدرس الميكروبيولوجيا الزراعية - كلية الزراعة - جامعة دمياط

صمم الجدول التالى فى ورقة إجابة مع كتابة اسمك وقسمك عليها

رقم السؤال	إجابة السؤال	الإجابة الصواب	الدرجة
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
مجموع الدرجات			

أجب من فضلك على الأسئلة التالية فى المكان المخصص لإجابة السؤال بوضع علامة صح أو خطأ أما كل سؤال مما يأتى
1

** ملحوظة هامة :
تجنب كل شطب أو قشط حتى لا تفقد الدرجات

1- المزرعة النقية stab cultures هى تلك المزرعة التى تحتوى على نواع واحد فقط من الميكروبات.
2- المزرعة المائلة slant هى تلك المزارع التى تلقح بإبرة التلقيح ذات العقدة needle.
3- من عيوب الطريقة الكيميائية لإختبار كفاءة التعقيم أنها تختبر مدة التعقيم فقط ولا تختبر درجة الحرارة ويستخدم فيها ميكروب *Bacillus stearothermophilis*.
4- التلقيح الميكروبى incubation هو ادخال ميكروبات الى بيئة مغذية.
5- توجد الميكروبات فى كل مكان من حولنا ولا يوجد مكان يخلو منها وهى توجد فى صورة مختلطة axenic.
6- التحضين هى عملية حفظ البيئات الغذائية الملقحة على درجة حرارة وفترة زمنية مناسبة حتى تنمو وتكاثر الميكروبات مكونة مستعمرات colonies يمكن رؤيتها بالعين المجردة.
7- يجب وضع مزارع الأطباق فى مجاميع (4-5 أطباق) على أن تكون مقلوبة فى الأتوكلاف Incubator لتجنب تلوثها.
8- تلقيح بيئات الأجار العميق بإبرة التلقيح loop فتكون مزارع الاهتزاز.
9- يجب مراعاه صب البيئات فى أطباق بترى تحت شروط التعقيم عند عمل مزارع slope culture.
10- عند تنمية ميكروبات mesophiles يجب ضبط درجة حرارة الحضان على 15°م.

سلم ورقة الإجابة إلى زميلك

سوف يتم مراجعة الإمتحان لمعرفة الإجابة الصواب

يقوم زميلك بعد معرفة الاجابة الصواب بوضع درجة واحد أمام كل إجابة صحيحة

يقوم زميلك بعد معرفة الاجابة الصواب بوضع علامة خطأ أمام كل إجابة خاطئة

يقوم زميلك بحساب مجموع الدرجات

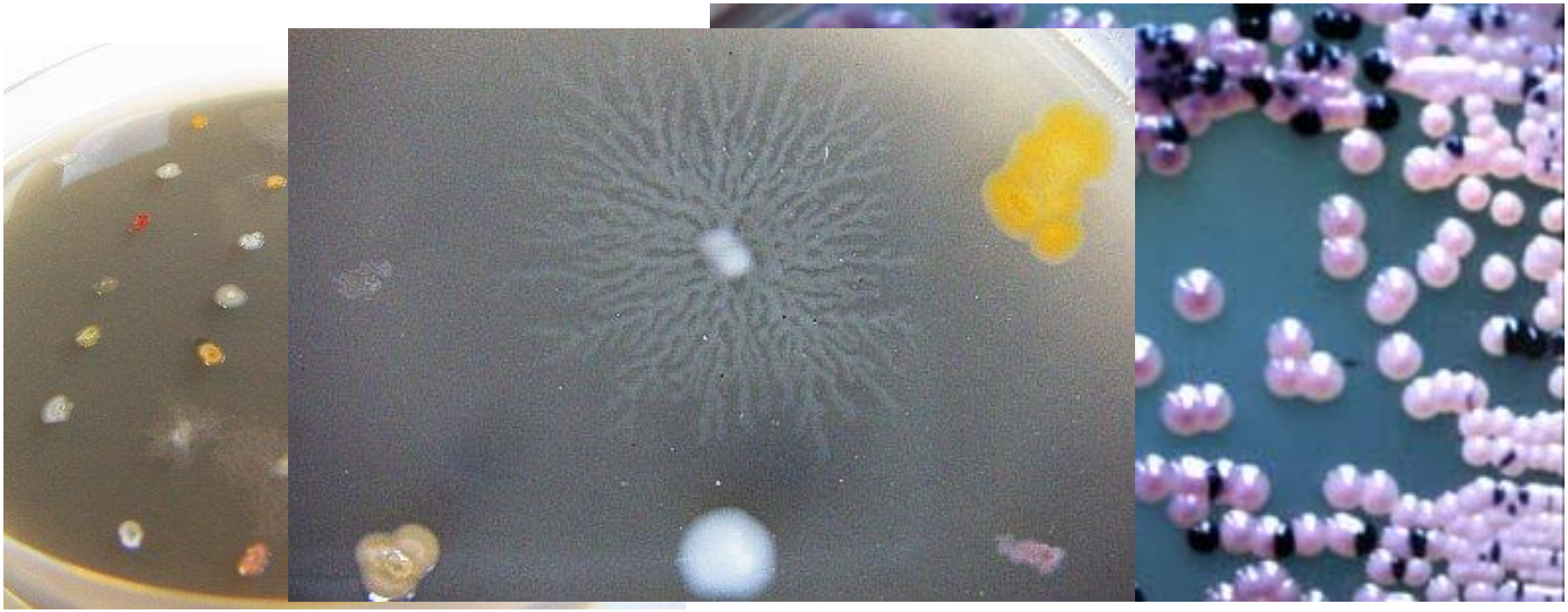
دراسة أشكال المستعمرات

دراسة المجموعات (المستعمرات) البكتيرية Study of bacterial colonies

1- الشكل

دائرى إهليلجى مغزلى مثلث الأقسام

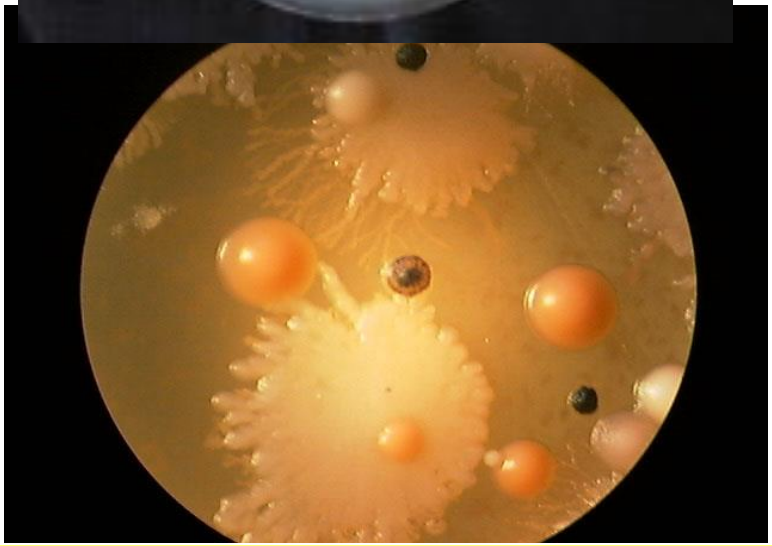
قوقعى غير منتظم شكل الوردة جذرى خيطى



2- التركيب الداخلى

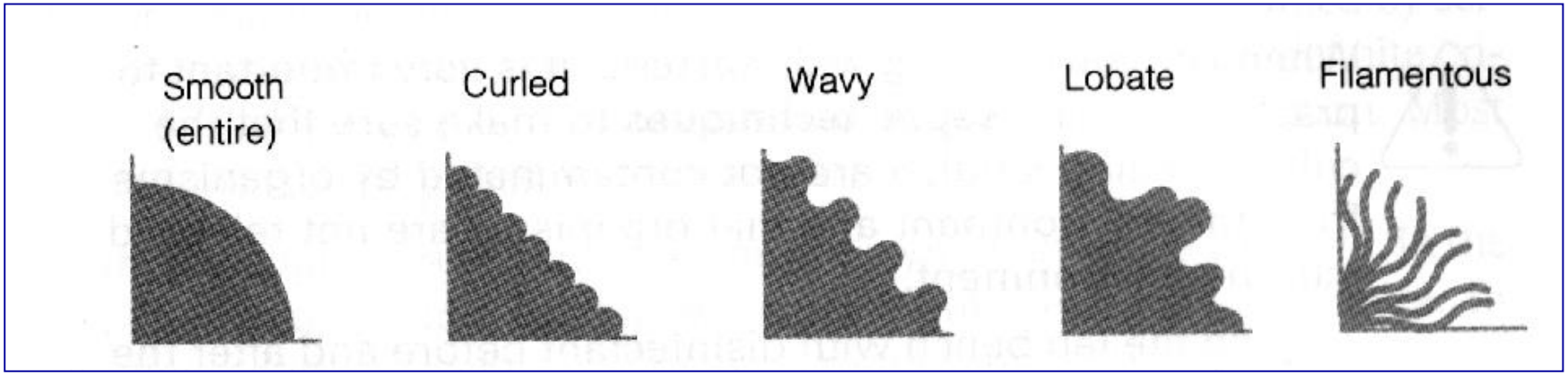
حبيبى متراكم　　حبيبى خشن　　شبكى　　مغضن

مشع　　ذو مناطق دائرية　　مجعد　　ذو مجموعات ثانوية



3- الحافة

كاملة مفصصة هدبية متموجة ممزقة



4- الإرتفاع

مسطح مرتفع مدرج محدب قطرى

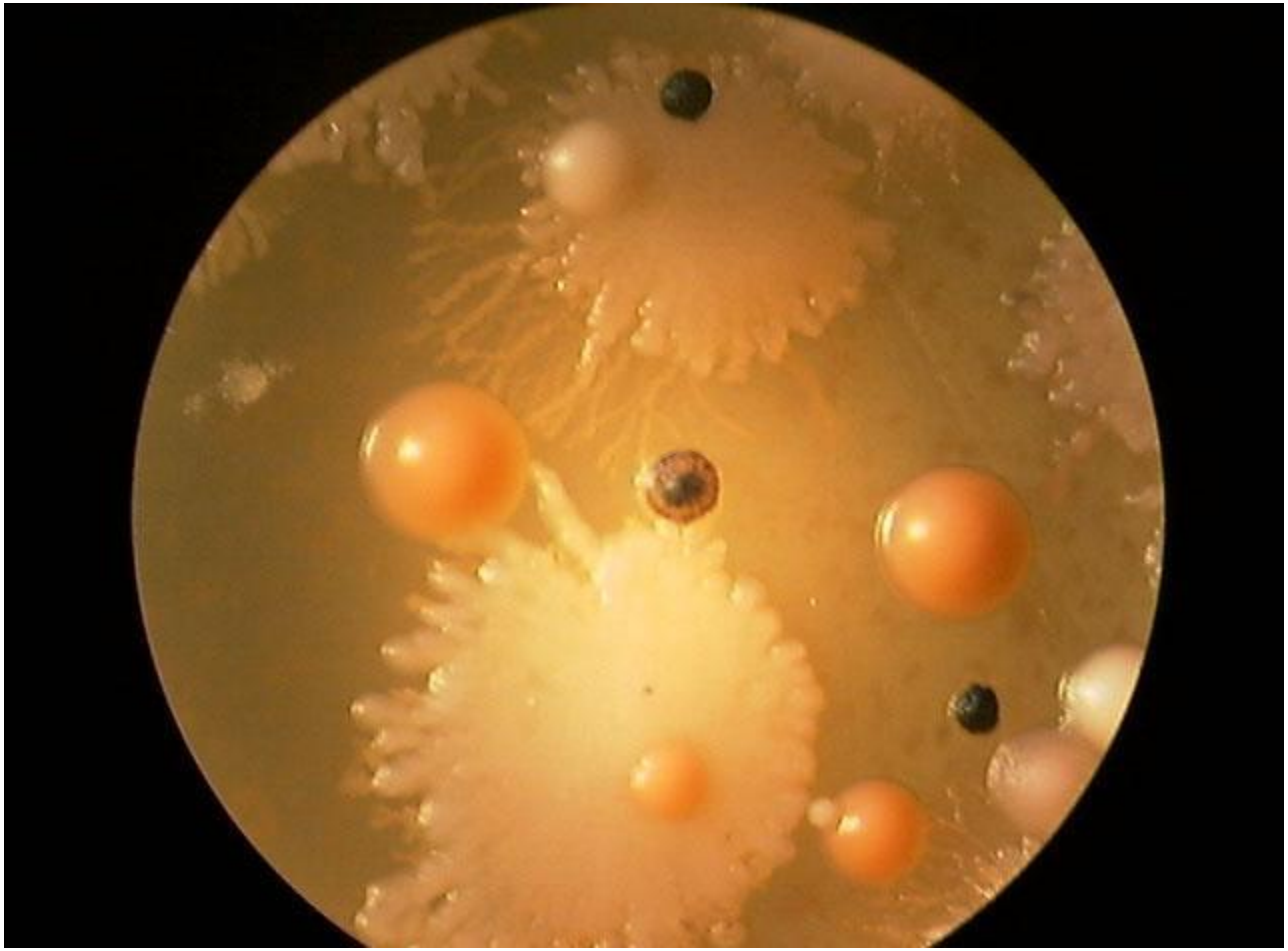
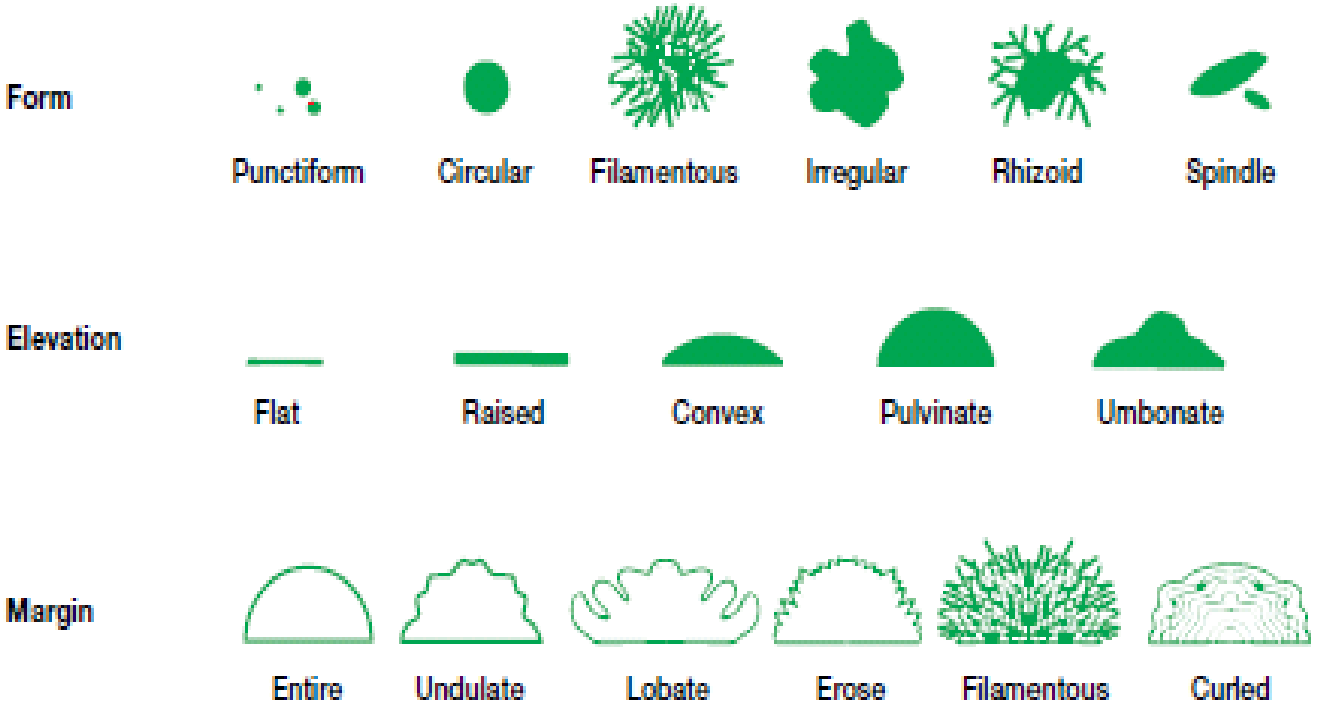


Figure 15.1 Bacterial Colony Characteristics on Agar Media as Seen with the Naked Eye. The characteristics of bacterial colonies are described using the following terms.



Appearance: Shiny or dull
Optical property: Opaque, translucent, transparent
Pigmentation: Pigmented (purple, red, yellow)
Nonpigmented (cream, tan, white)
Texture: Rough or smooth

1. Round

2. Round with Scalloped Margin

3. Round with Raised Margin

4. Wrinkled

5. Concentric

6. Irregular and Spreading

7. Filamentous

8. L-Form

9. Round with Radiating Margin

10. Filiform

11. Rhizoid

12. Complex

CONFIGURATIONS

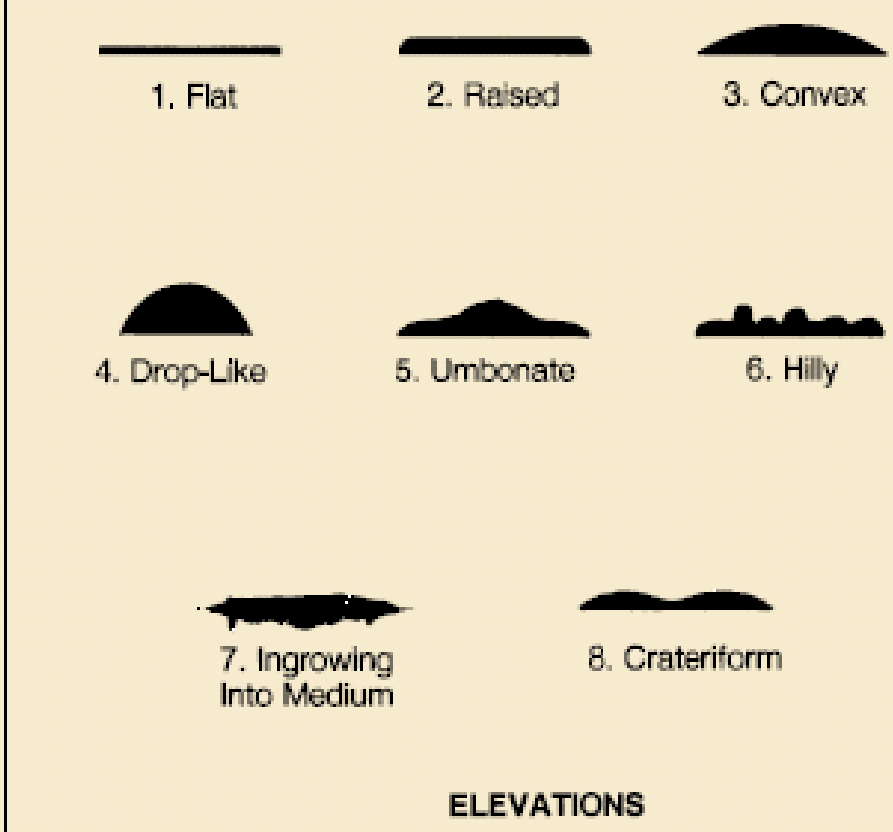
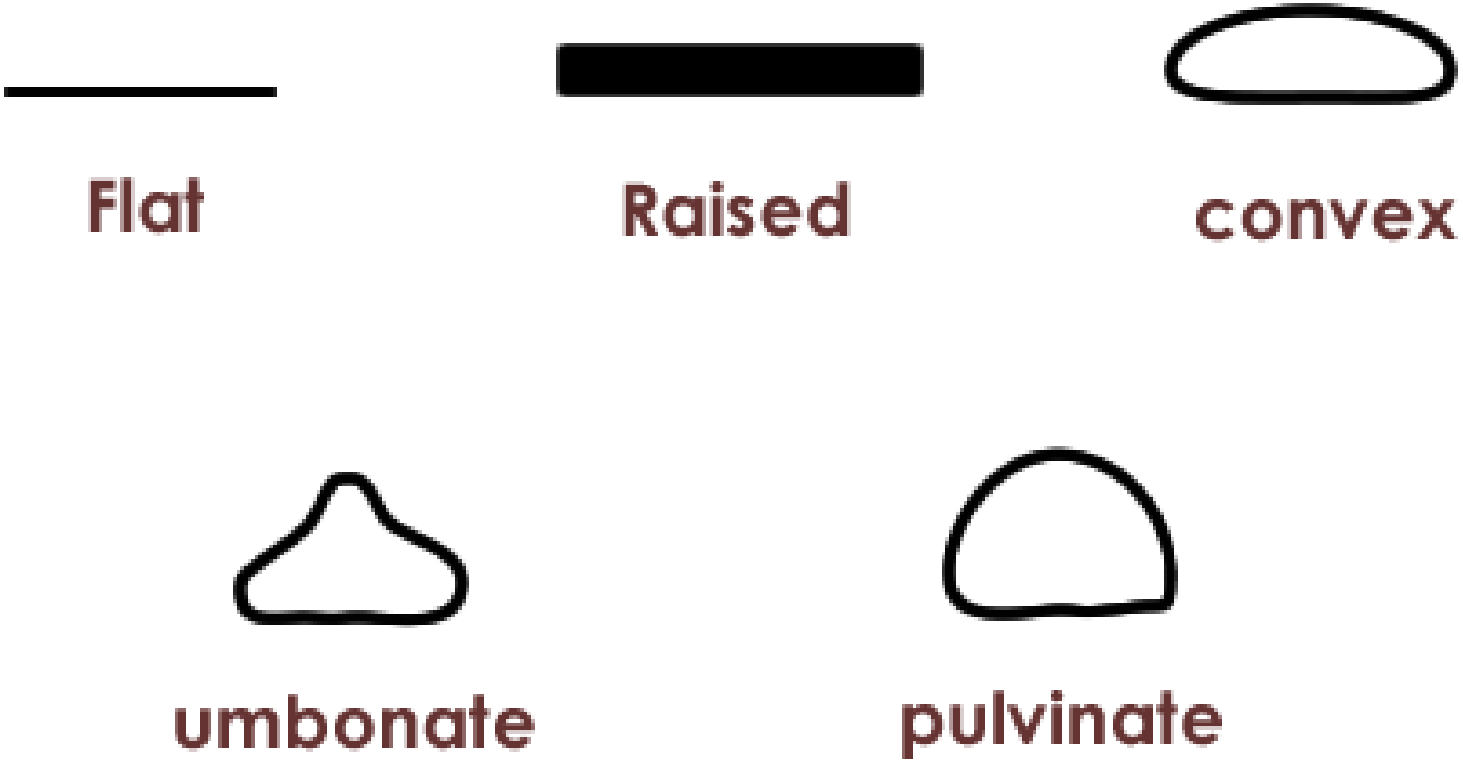


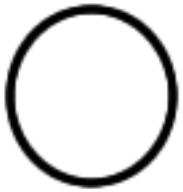
Figure 47.4 Colony characteristics

Bacterial Colony Elevation



Bacterial Colony Form

punctiform



circular

irregular

rhizoid

filamentous

spindle

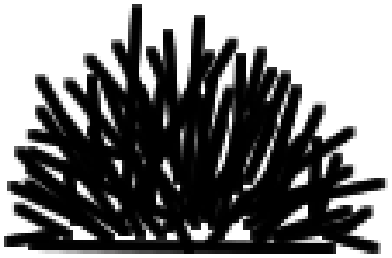
Bacterial Colony Margin

Entire

undulate

lobate

serrate or erose

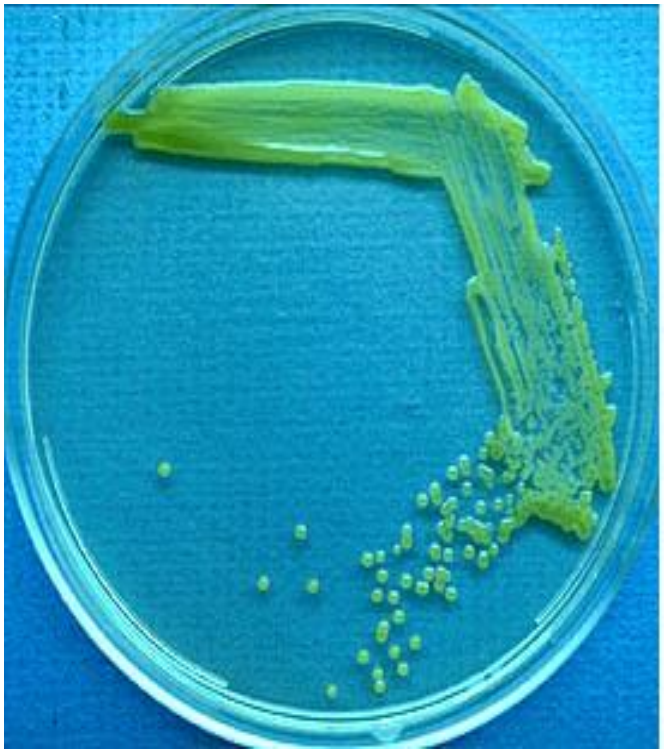


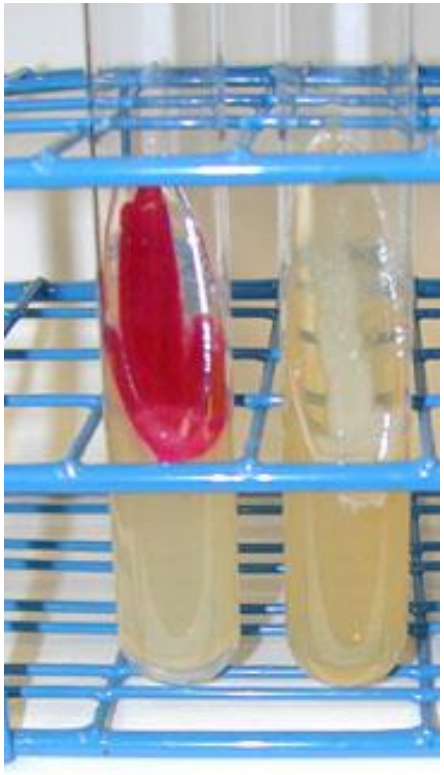
filamentous

curled

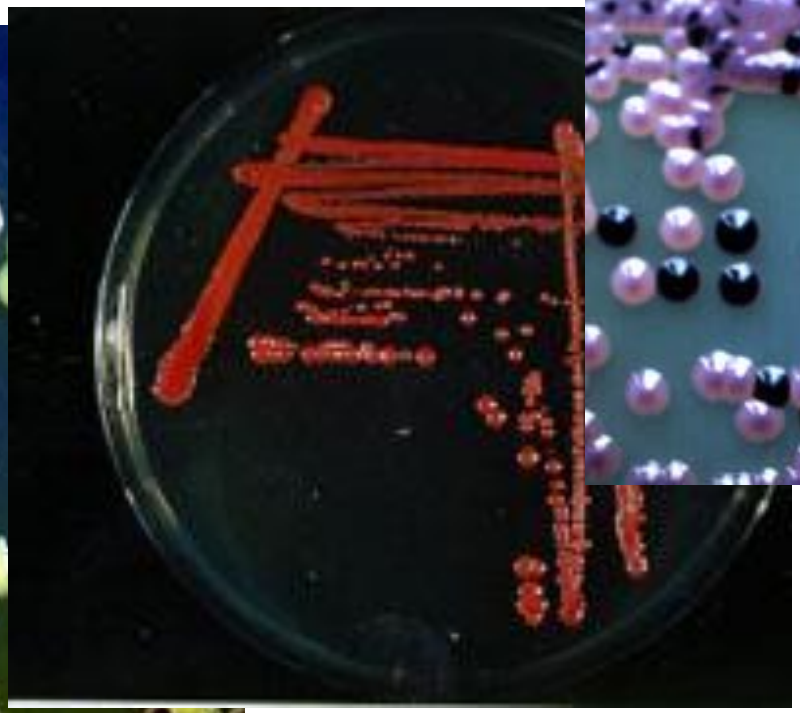
5- لون المستعمرة ولون البيئة حولها

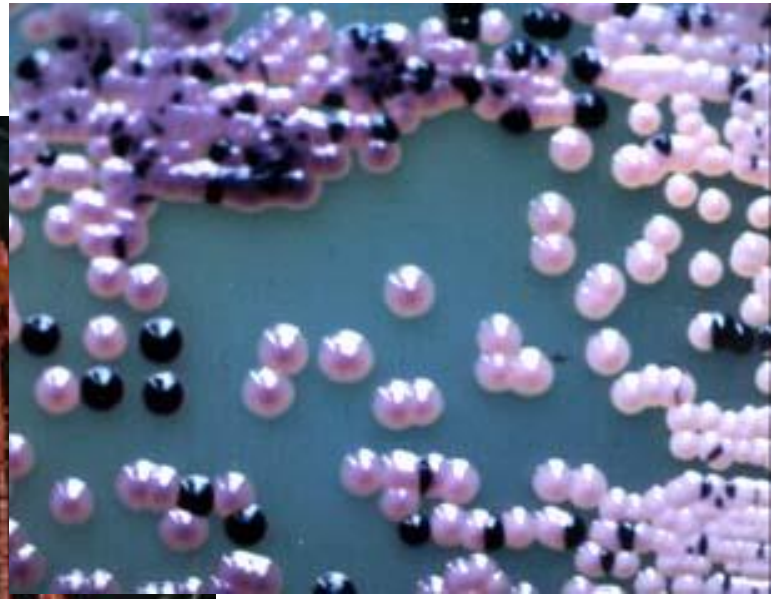
1- فى بعض المستعمرات تتكون صبغات لا تذوب في الماء وتكسب المستعمرة لون معين





2- البعض الآخر يفرز صبغات تذوب في البيئة لتكسبها لوناً خاصاً وهذه الصفة يمكن مشاهدتها بالعين المجردة .





6- الشفافية

شفافة　　نصف شفافة　　معتمة

7- السطح

لامعاً　　غير لامع

8- الإنتشار

منتشرة على سطح الآجار　　محدودة

9- الحجم

- يشاهد بسهولة بالعين المجردة لكبر حجم المجموعة
- دقيق جداً ويستعان فى الفحص بالعدسة اليدوية

10- القوام

مائى　　لزج　　ثقيل　　هش　　صلب

Cultural Characteristics

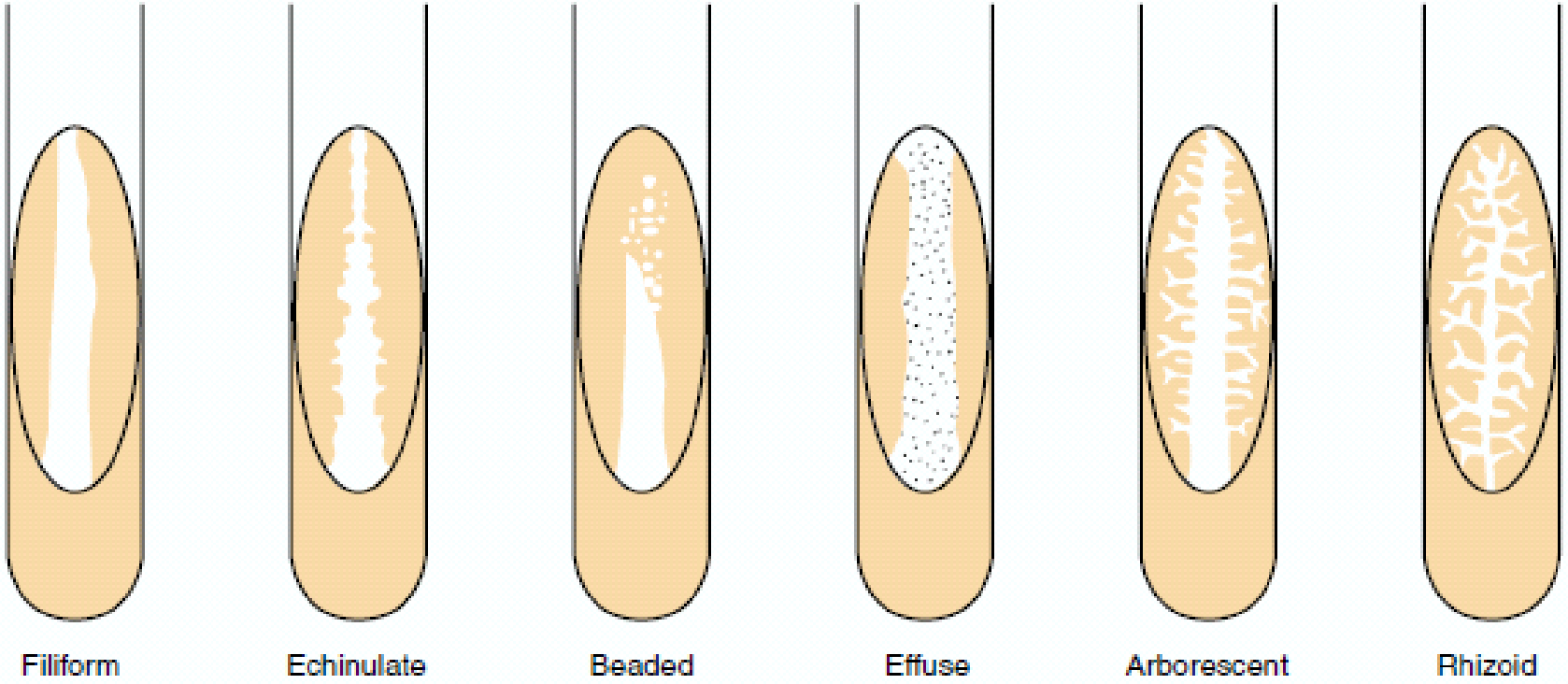
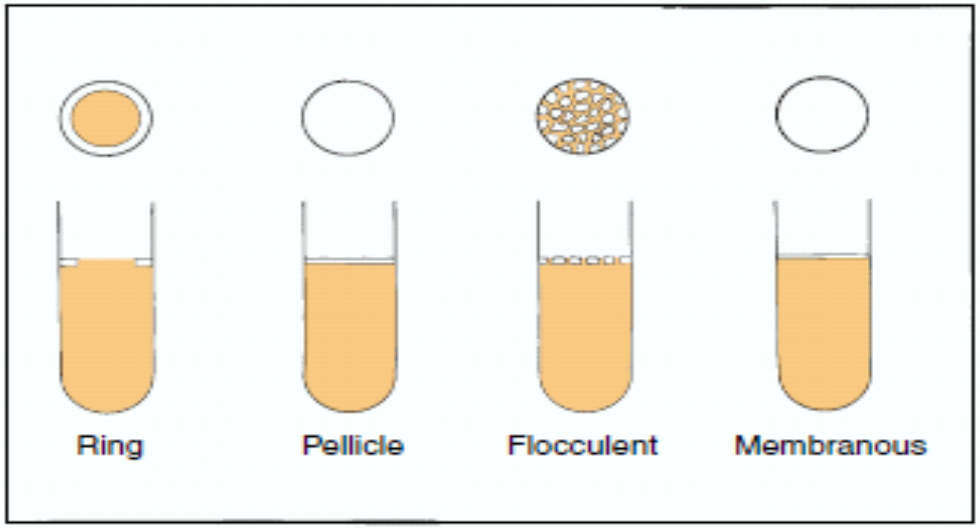
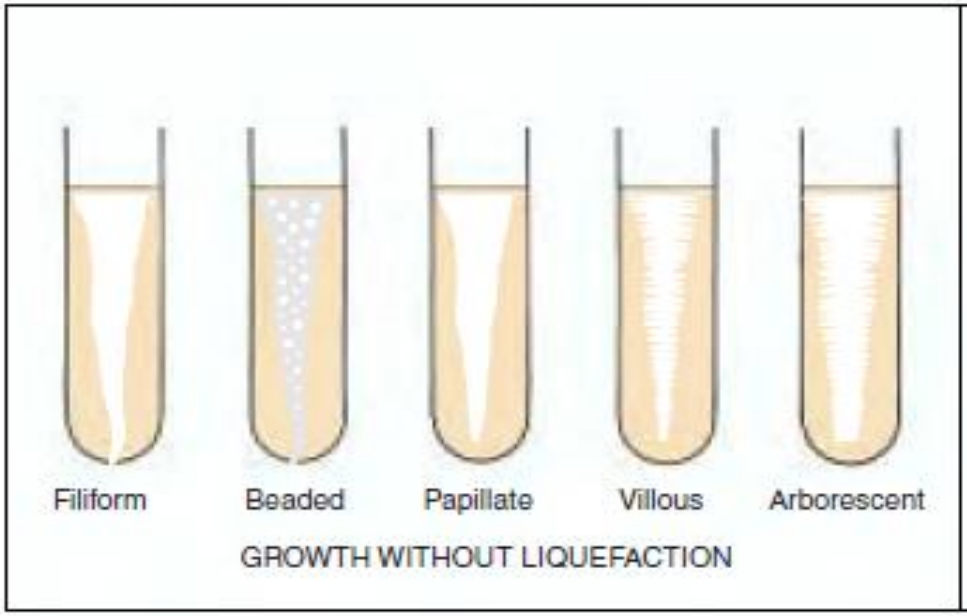


Figure 47.1 Types of bacterial growth on nutrient agar slants





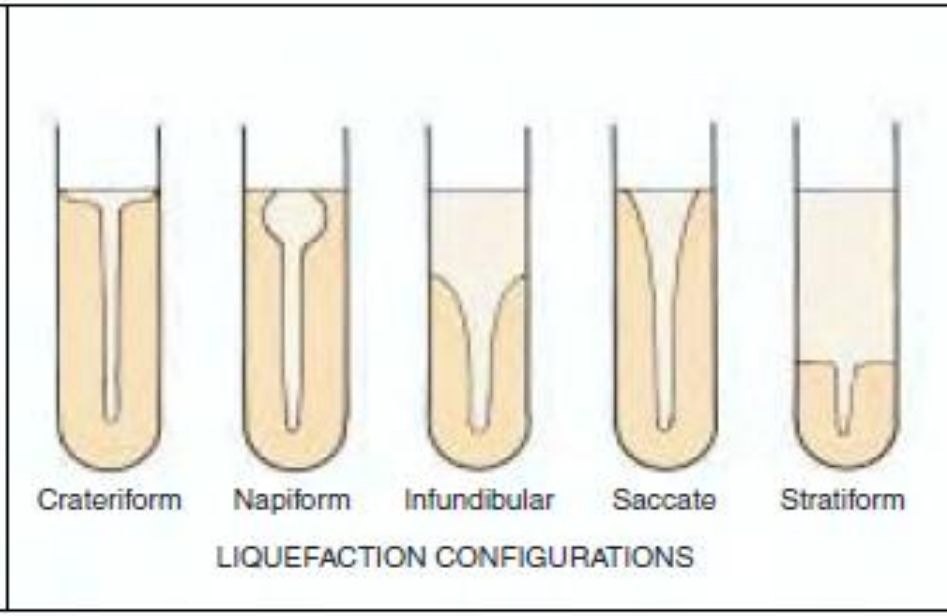


Figure 47.3 Growth in gelatin stabs

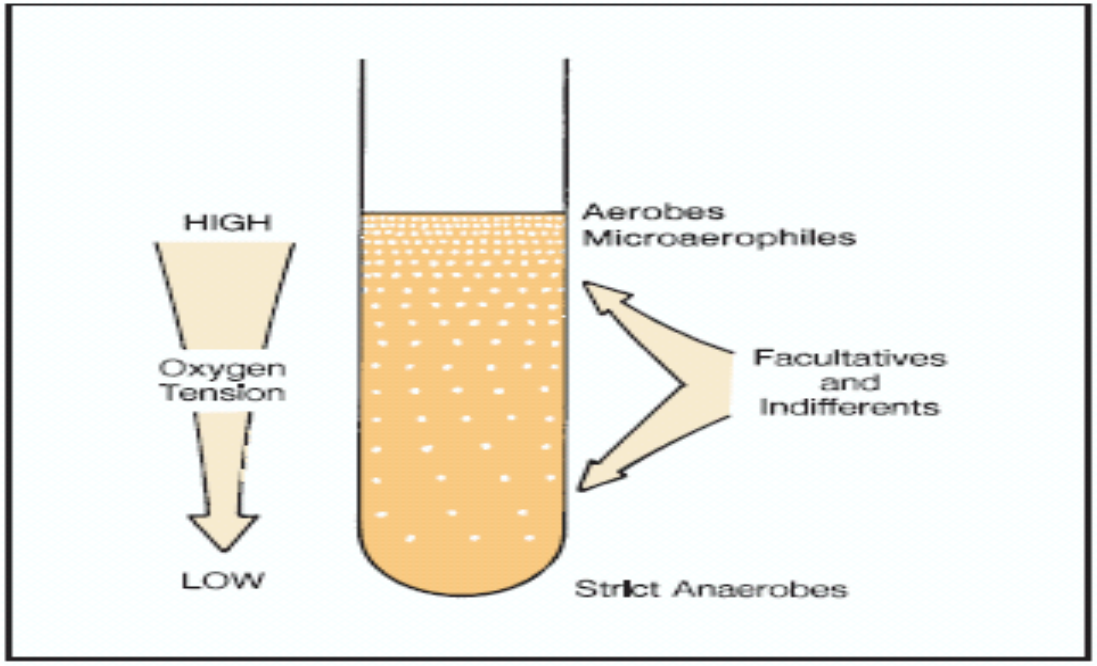
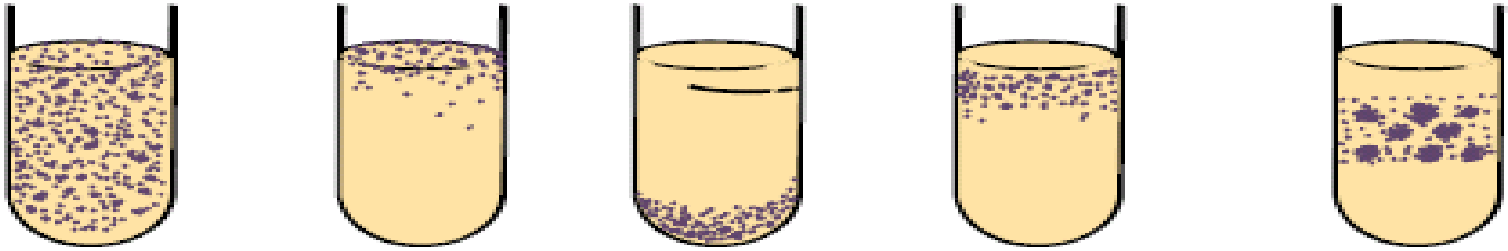


Figure 22.1 Oxygen needs of microorganisms

Figure 14.6 Some Typical Growth Patterns in Broth Media.



عزل وتنقية الميكروبات
Isolation and Purification of Microbes

لا توجد الميكروبات فى الطبيعة فى صورة نقية أى منعزلة كل نوع بمفرده، بل توجد مختلطة مع بعضها، ولدراسة خواص كل نوع يجب عزله بحالة نقية بحيث لا تحتوى المزرعة إلا نوع واحد فقط، وتجرى عملية العزل بعدة طرق منها :

1- طريقة الأطباق المصبوبة Pouring plate method

2- طريقة الأطباق المخطوطة Streaking plate method

أولاً : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المصبوبة

تعتمد فكرة هذه الطريقة على تخفيف العينة تحت الدراسة قبل زراعتها على البيئة الغذائية المناسبة وبذلك تنمو الميكروبات في مجاميع أو مستعمرات منعزلة عن بعضها حيث أن كل مستعمرة تكون ناتجة عن خلية ميكروب واحد أى فى مستعمرات فردية.

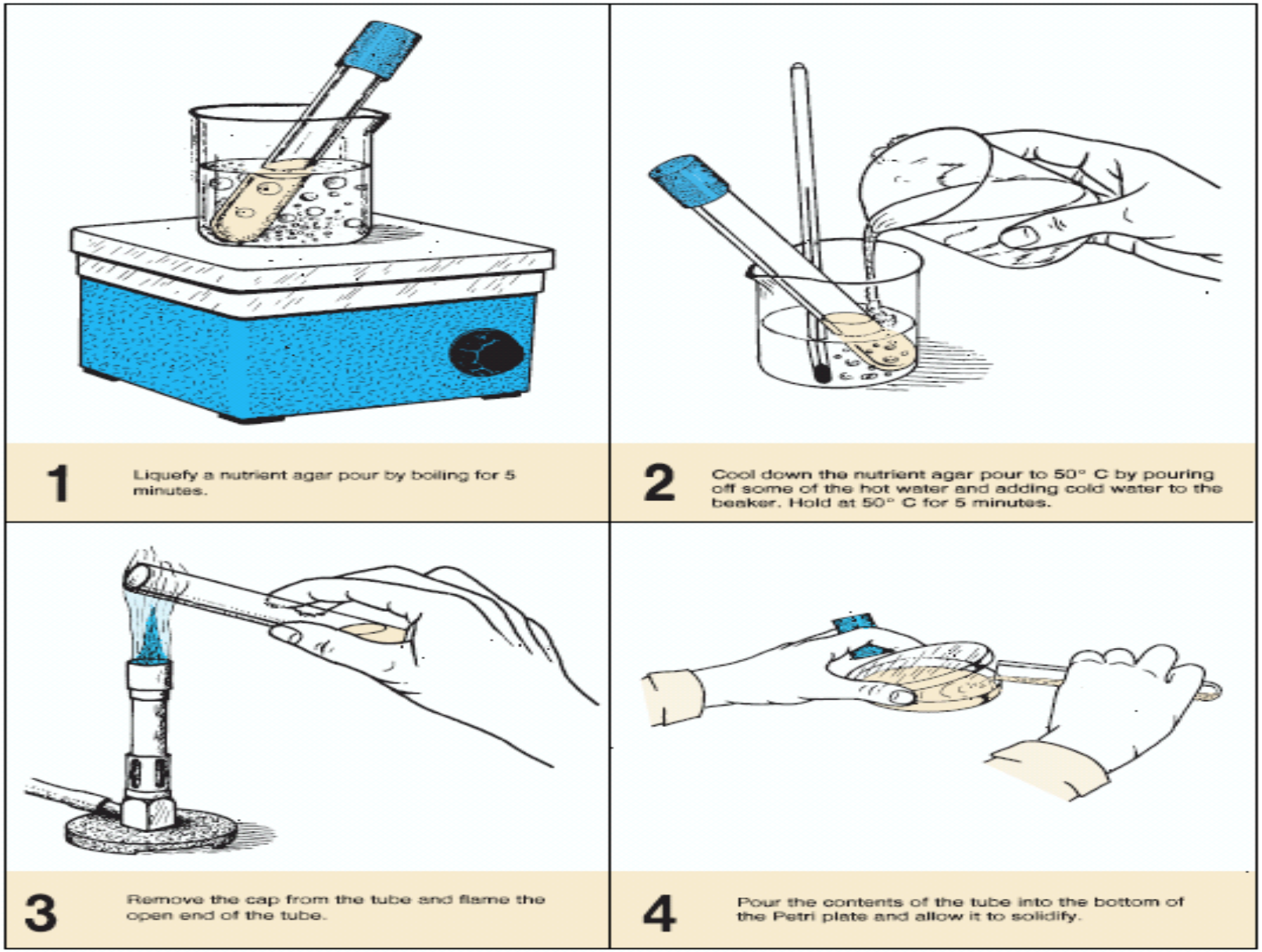


Figure 21.2 Procedure for pouring an agar plate for streaking

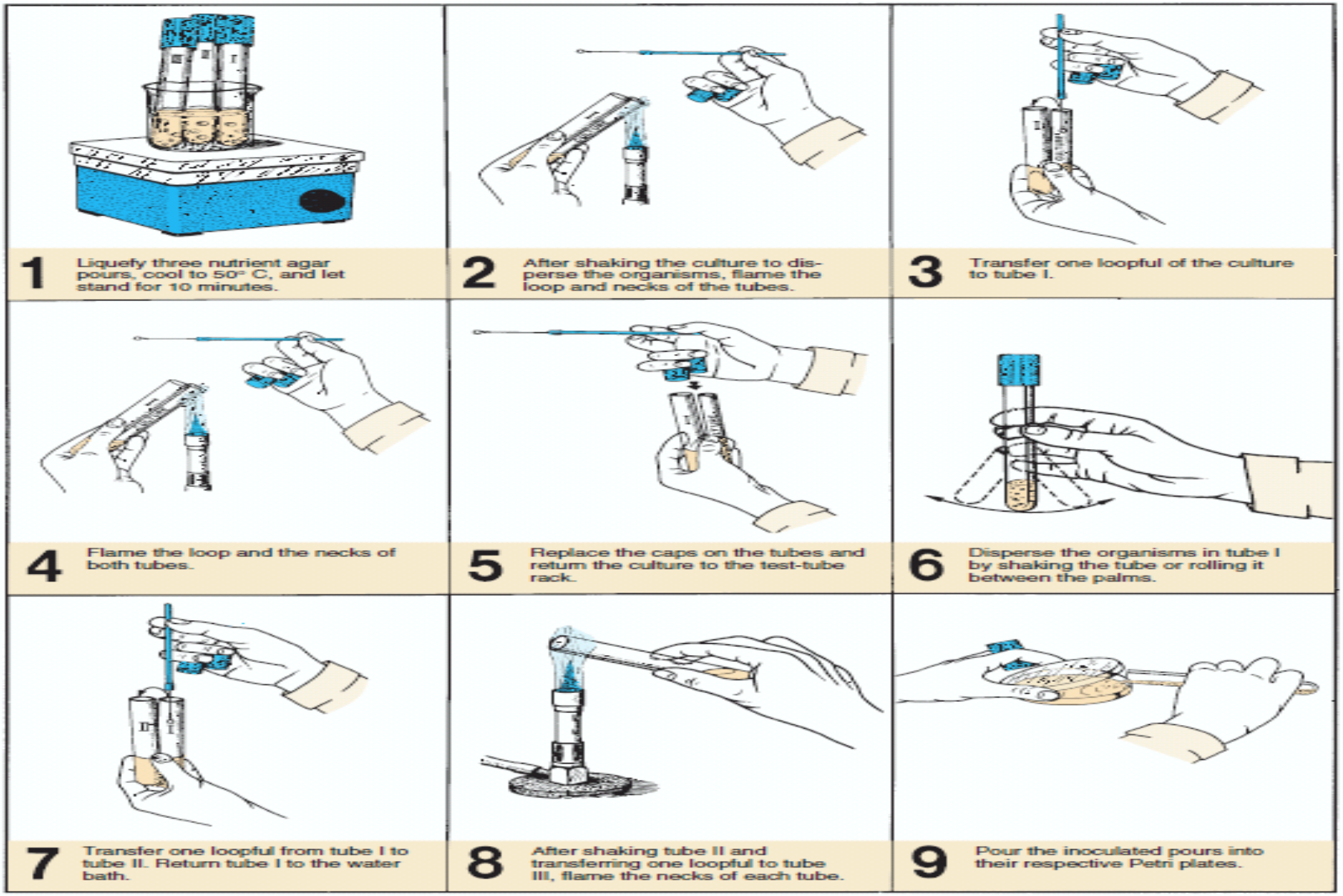
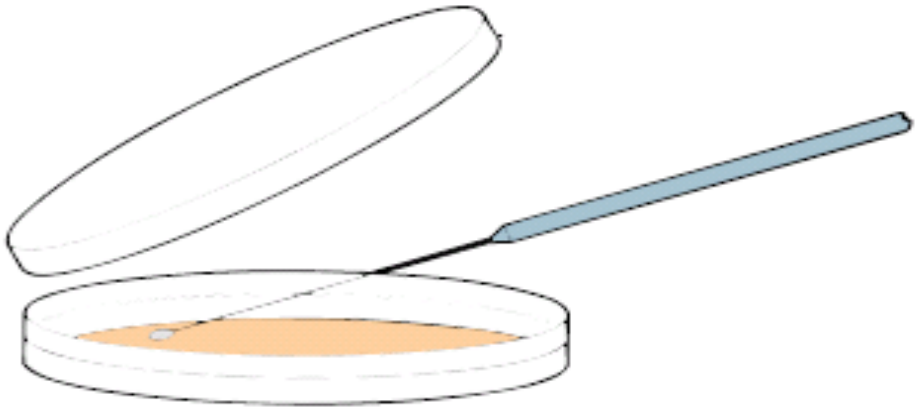
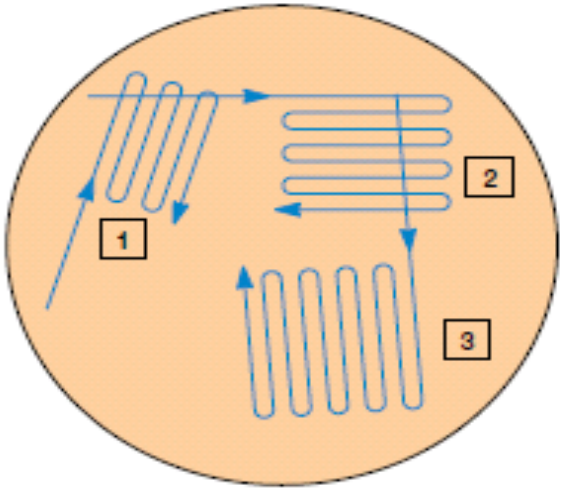


Figure 21.6 Tube-handling procedure in making inoculations for pour plates

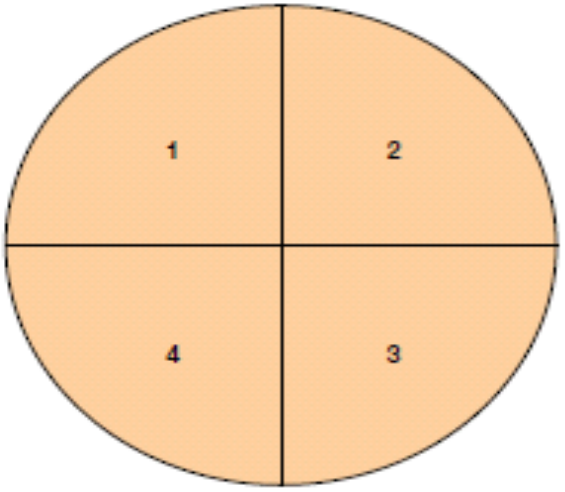
Figure 16.2 **Preparation of a Streak Plate.** Arrows indicate motion of the loop. In *b*, flame and cool the loop between 1 and 2, 2 and 3, and 3 and the end of the streak. The goal is to thin the numbers of bacteria growing in each successive area of the plate as it is rotated and streaked so that well isolated colonies will appear in quadrant 3.



(a)



(b)



(c)

Figure 15.2 **Spread-Plate Technique.**

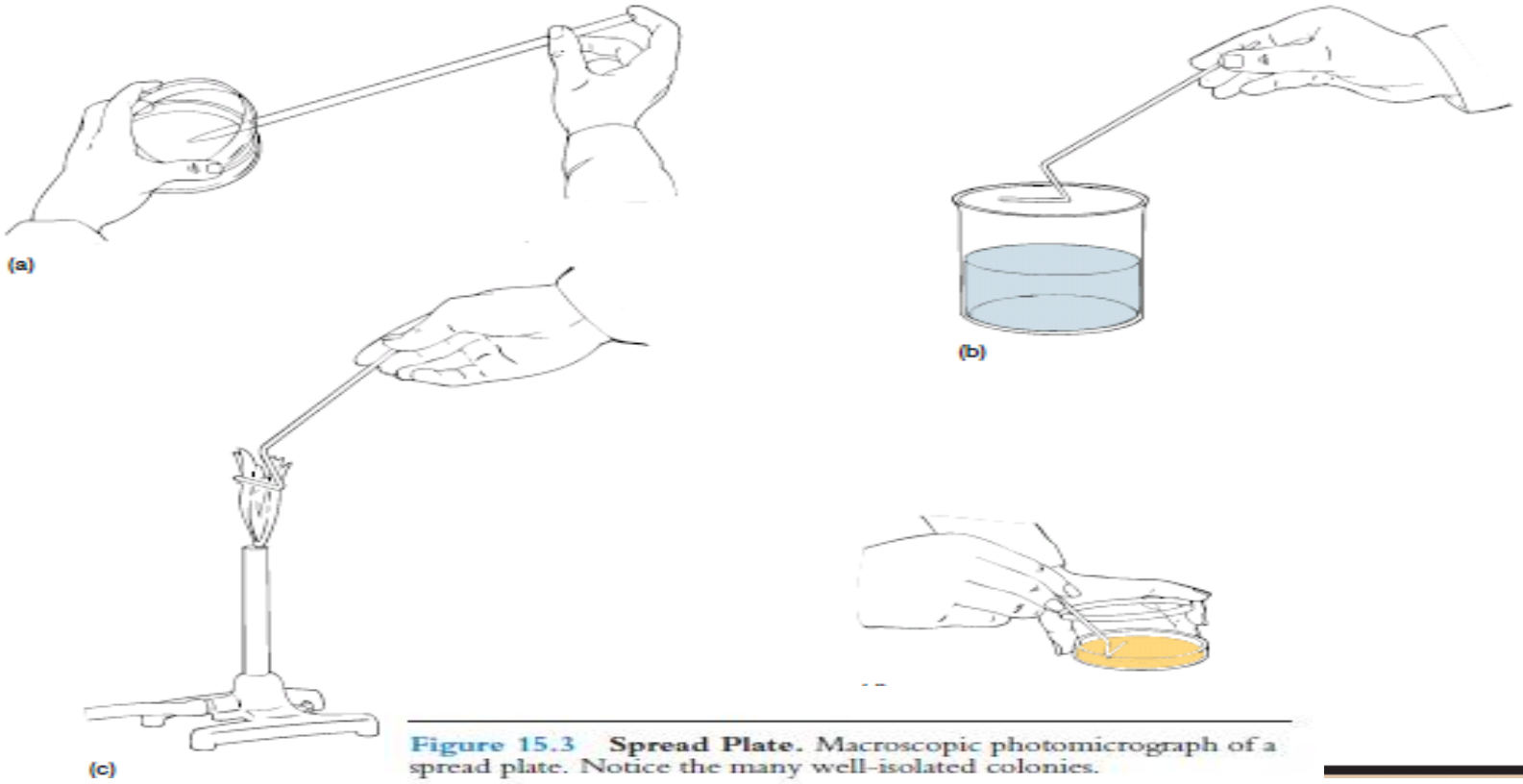


Figure 15.3 **Spread Plate.** Macroscopic photomicrograph of a spread plate. Notice the many well-isolated colonies.

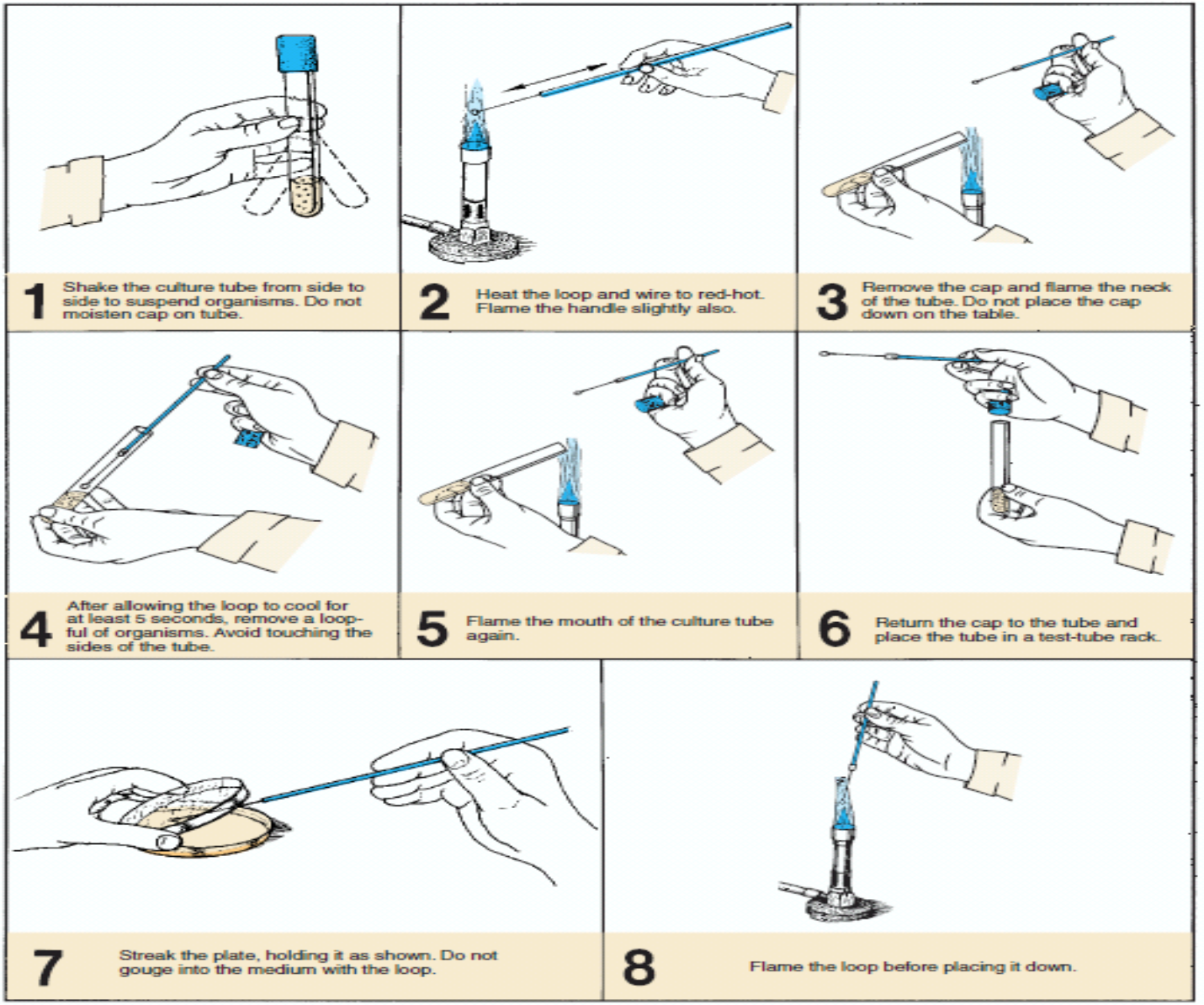
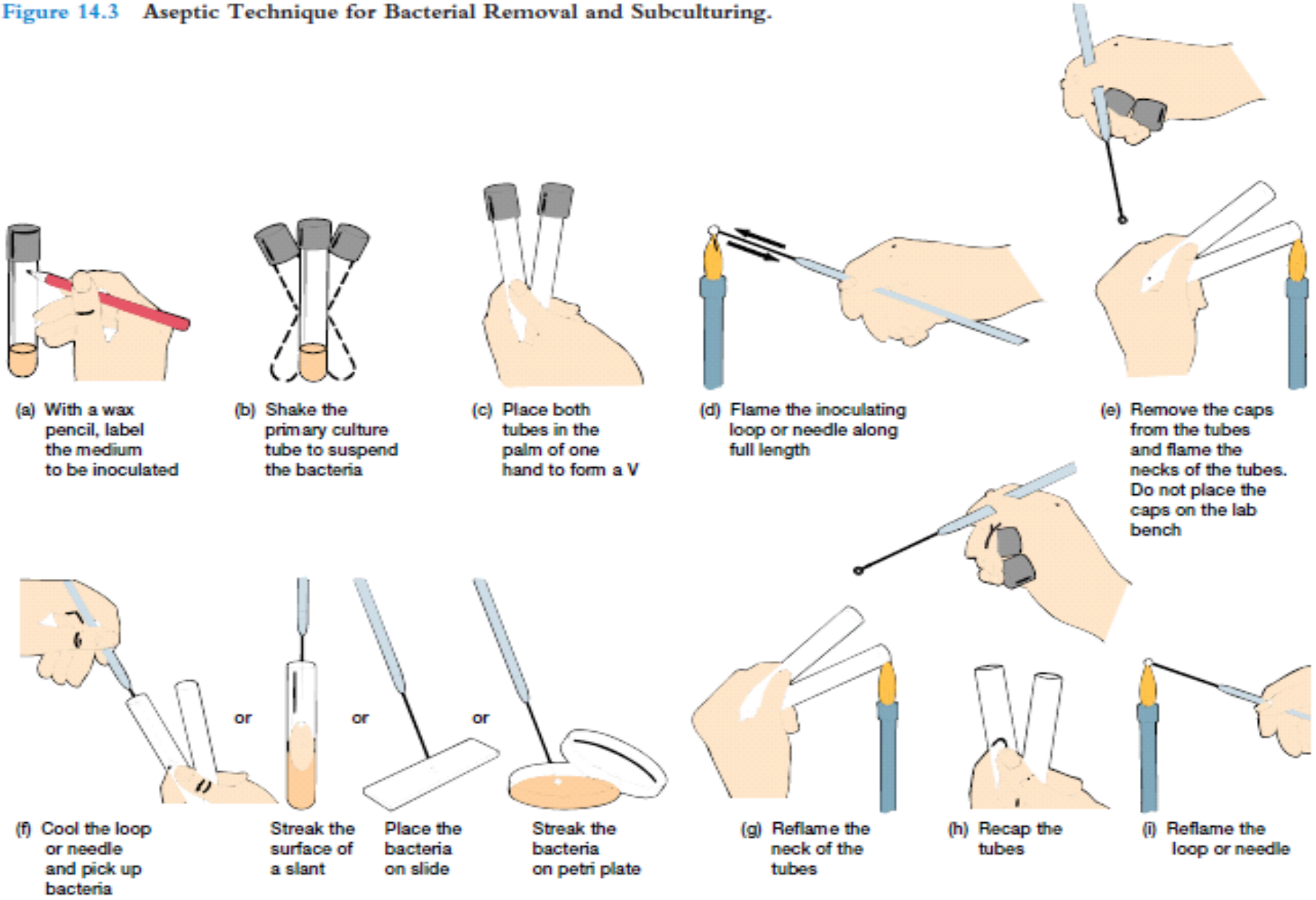


Figure 21.3 Routine for inoculating a Petri plate

Figure 14.3 Aseptic Technique for Bacterial Removal and Subculturing.



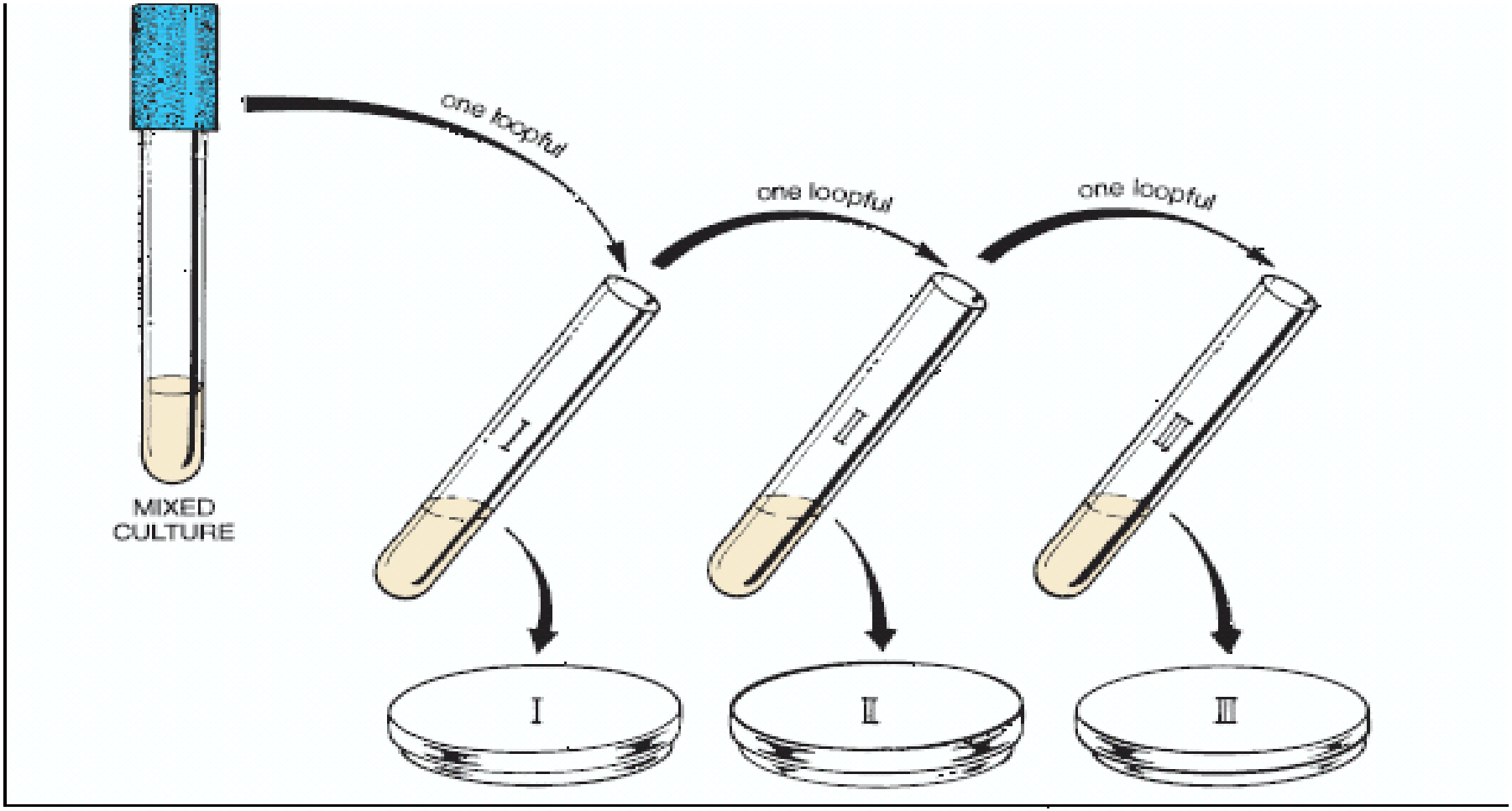
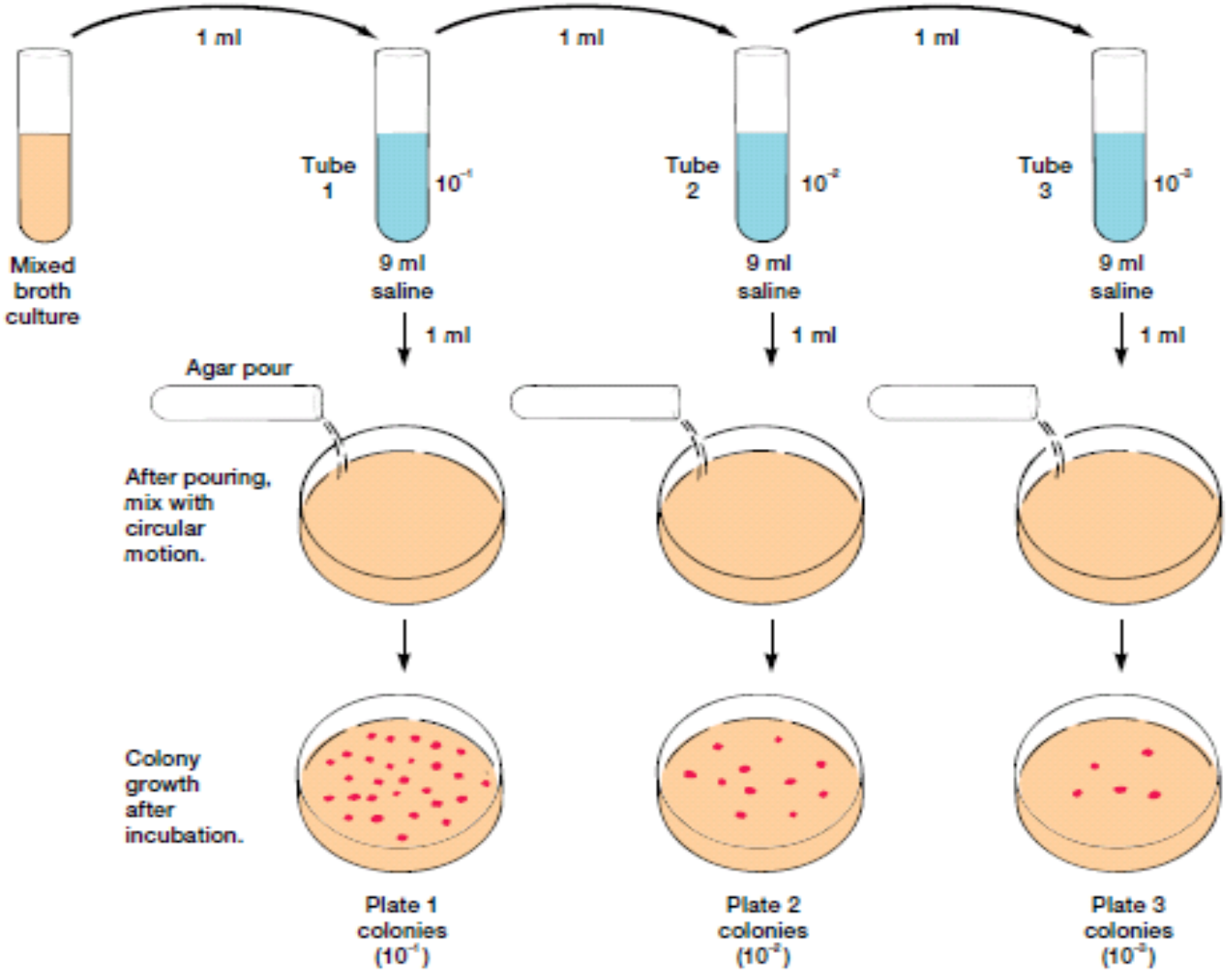
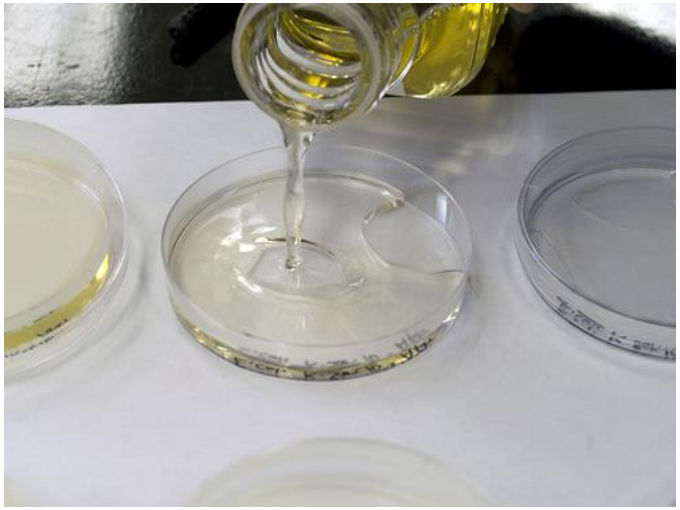
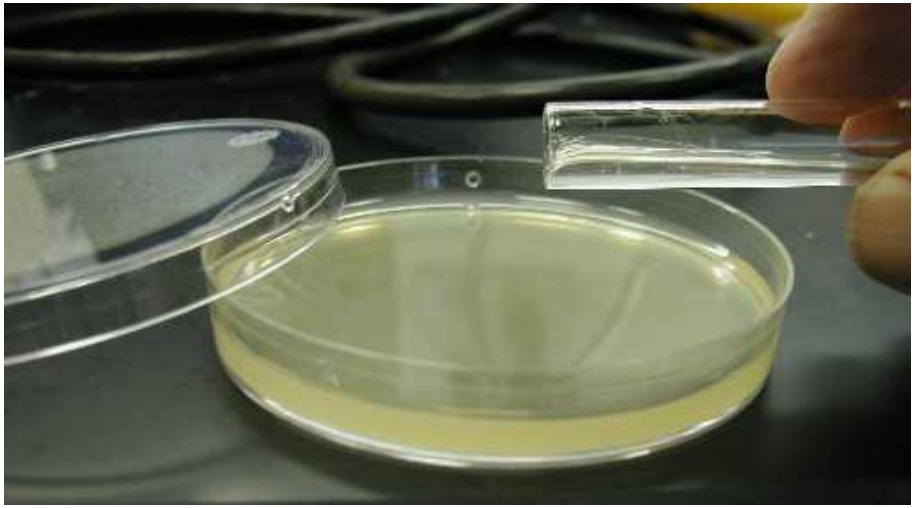


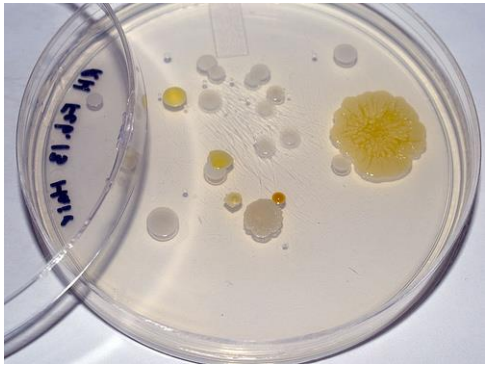
Figure 21.5 Three steps in the loop dilution technique for separating out organisms

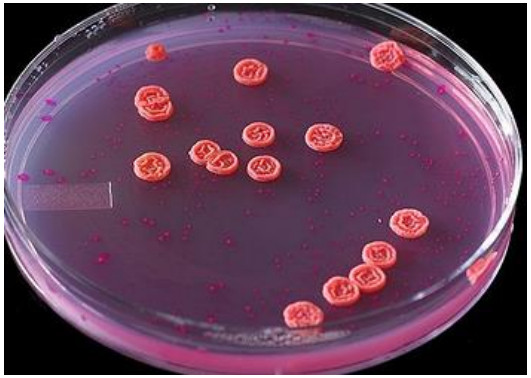
Figure 17.1 The Pour-Plate Technique. The original sample is diluted several times to decrease or dilute the population sufficiently. 1 ml of each dilution is then dispensed into the bottom of a petri plate. Agar pours are then added to each plate. Isolated cells grow into colonies and can be used to establish pure cultures. The surface colonies are circular and large, subsurface colonies are lenticular or lens-shaped and much smaller.











ثانياً : عزل البكتيريا بطريقة الأطباق المخططة

التخطيط Streaking هو نشر الخلايا الميكروبية على سطح بيئة صلبة أى محتوية على الآجار، بإبرة ذات عقدة loop أو إبرة منحنية الطرف bent needle ، ويطلق على الطبق المجهز بالتخطيط مسمى طبق مخطوط streak plate ، والغرض من التخطيط هو تقليل عدد البكتيريا العالقة بإبرة التلقيح تدريجياً بحيث فى نهاية خطوط التلقيح تصبح الميكروبات متباعدة فى الطبق وتنمو وتكون مستعمرات فردية منعزلة .

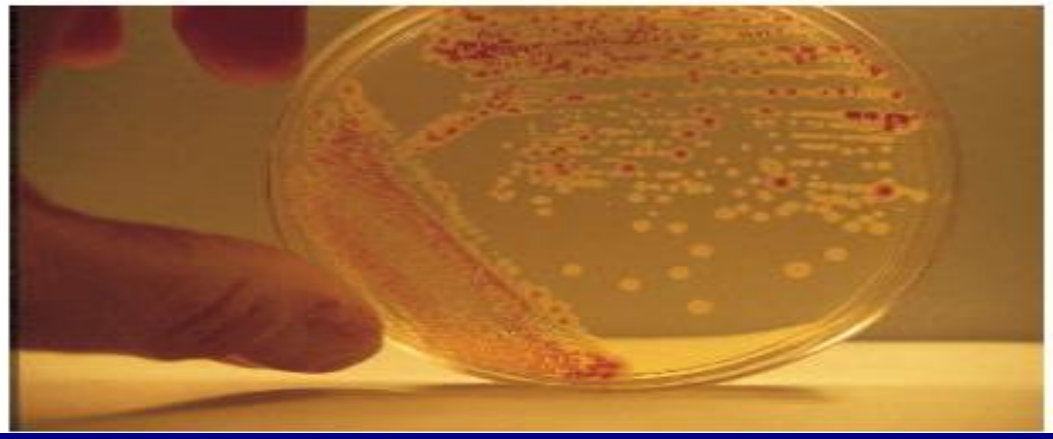
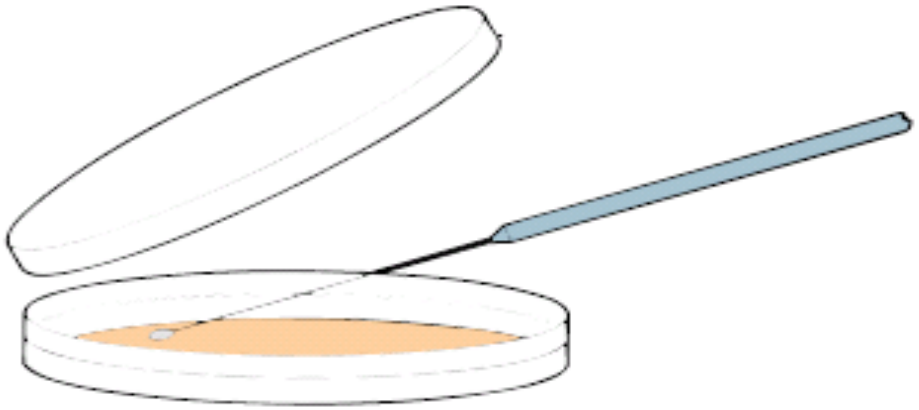
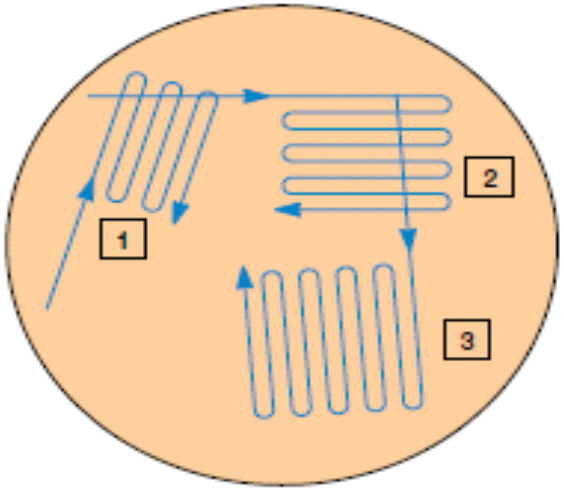


Figure 16.1 **Streak Plate.** Notice the well-isolated colonies of *E. coli* (white) and *S. marcescens* (red).

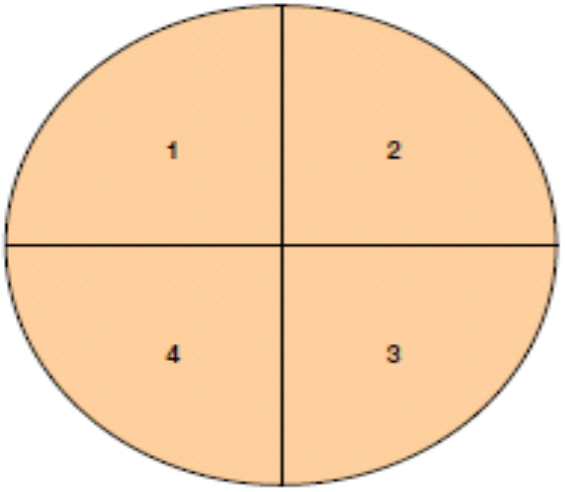
Figure 16.2 **Preparation of a Streak Plate.** Arrows indicate motion of the loop. In *b*, flame and cool the loop between 1 and 2, 2 and 3, and 3 and the end of the streak. The goal is to thin the numbers of bacteria growing in each successive area of the plate as it is rotated and streaked so that well isolated colonies will appear in quadrant 3.



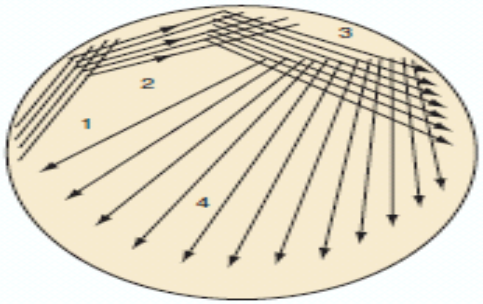
(a)



(b)

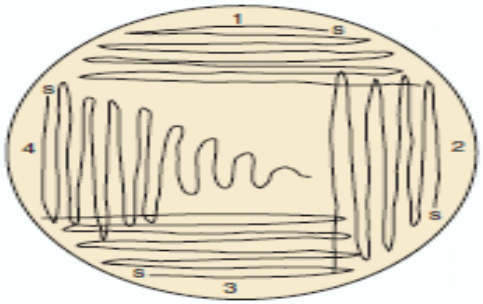


(c)



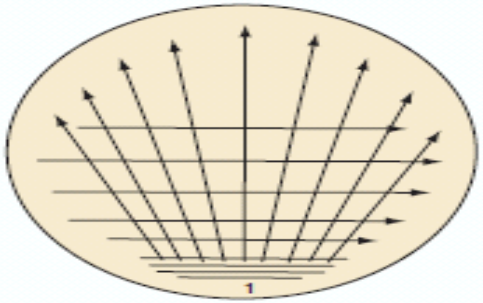
QUADRANT STREAK
(Method A)

1. Streak one loopful of organisms over Area 1 near edge of the plate. Apply the loop lightly. Don't gouge into the medium.
2. Flame the loop, cool 5 seconds, and make 5 of 6 streaks from Area 1 through Area 2. Momentarily touching the loop to a sterile area of the medium before streaking insures a cool loop.
3. Flame the loop again, cool it, and make 6 or 7 streaks from Area 2 through Area 3.
4. Flame the loop again and make as many streaks as possible from Area 3 into Area 4, using up the remainder of the plate surface.
5. Flame the loop before putting it aside.



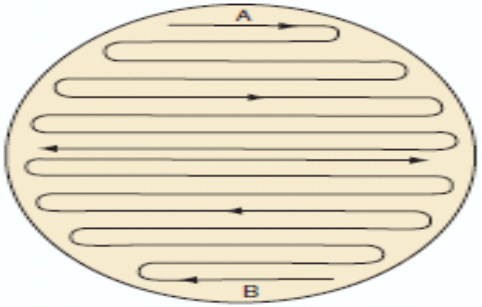
QUADRANT STREAK
(Method B)

1. Streak one loopful of organisms back and forth over Area 1, starting at point designated by "s". Apply loop lightly. Don't gouge into the medium.
2. Flame the loop, cool 5 seconds and touch the medium in sterile area momentarily to insure coolness.
3. Rotate the dish 90 degrees while keeping the dish closed. Streak Area 2 with several back and forth strokes, hitting the original streak a few times.
4. Flame the loop again. Rotate the dish and streak Area 3 several times, hitting last area several times.
5. Flame the loop, cool it, and rotate the dish 90 degrees again. Streak Area 4, contacting Area 3 several times and drag out the culture as illustrated.
6. Flame the loop before putting it aside.



RADIANT STREAK

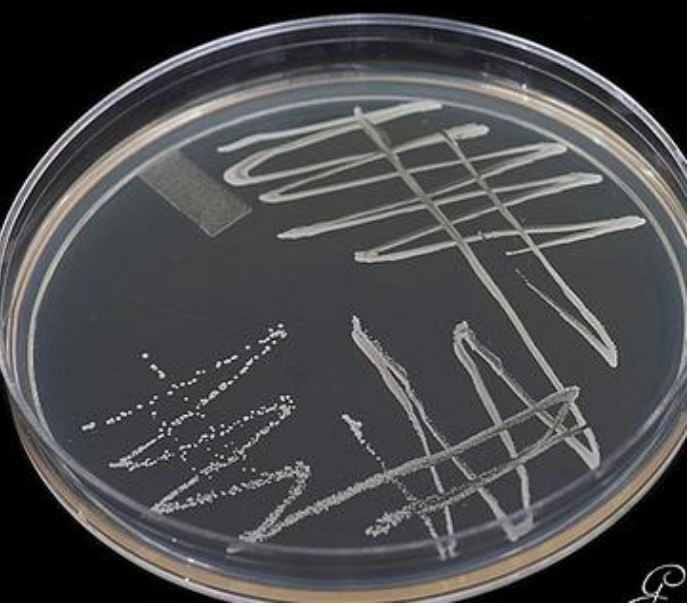
1. Spread a loopful of organisms in small area near the edge of the plate in Area 1. Don't gouge medium.
2. Flame the loop and allow it to cool for 5 seconds. Touching a sterile area of the medium will insure coolness.
3. **From the edge** of Area 1 make 7 or 8 straight streaks to the opposite side of the plate.
4. Flame the loop again, cool it sufficiently, and cross streak over the last streaks, **starting near Area 1.**
5. Flame the loop again before putting it aside.

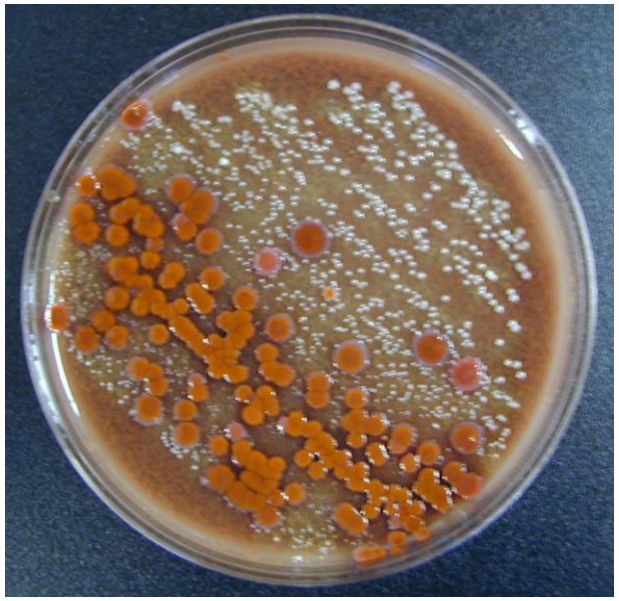


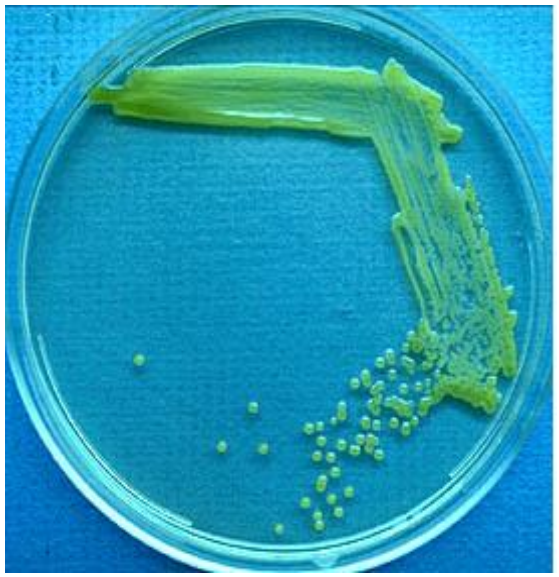
CONTINUOUS STREAK

1. Starting at the edge of the plate (Area A) with a loopful of organisms, spread the organisms in a single continuous movement to the center of the plate. Use light pressure and avoid gouging the medium.
2. Rotate the plate 180 degrees so that the uninoculated portion of the plate is away from you.
3. Without flaming loop, and using the same face of the loop, continue streaking the other half of the plate by starting at Area B and working toward the center.
4. Flame your loop before putting it aside.

Figure 21.4 Four different streak techniques







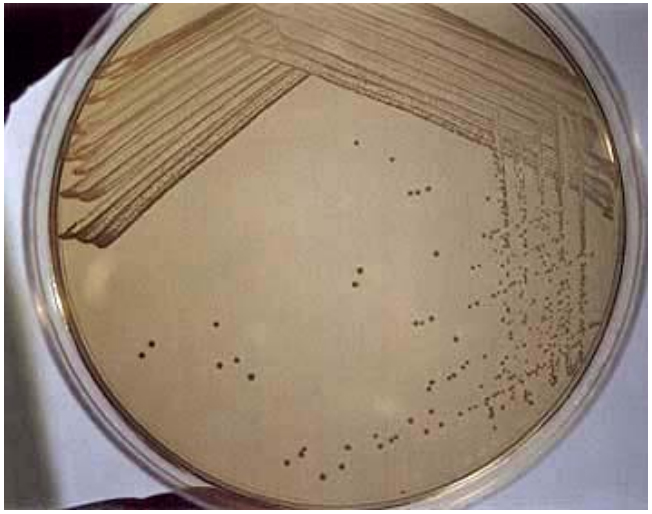


Figure 15.2 **Spread-Plate Technique.**

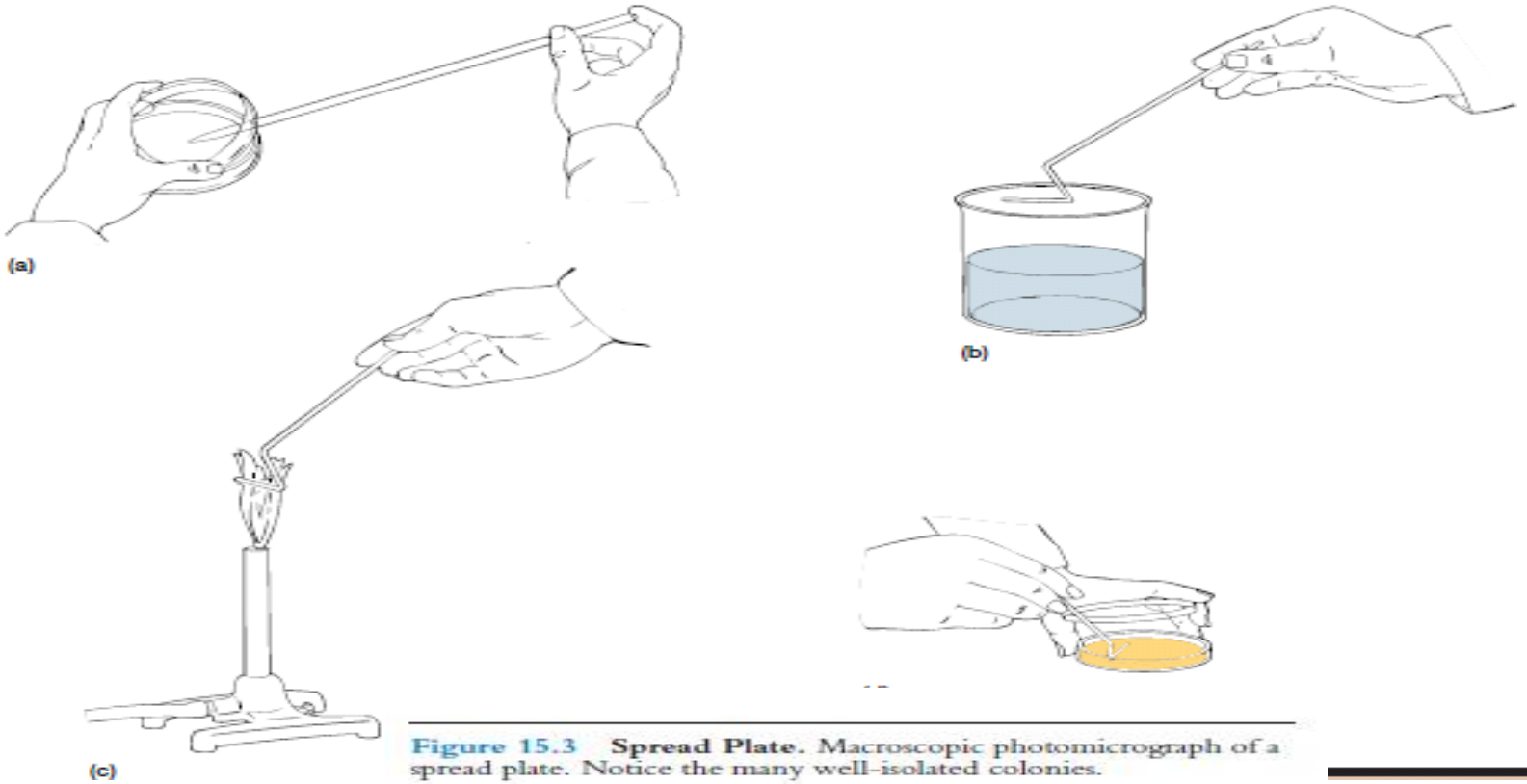


Figure 15.3 **Spread Plate.** Macroscopic photomicrograph of a spread plate. Notice the many well-isolated colonies.

Maintenance طرق حفظ المزارع البكتيرية

بعد عزل الميكروبات فى مزارع نقية يجب المحافظة عليها لأطول فترة ممكنة بإحدى الطرق التالية:

1- التنمية على بيئة الأجار المغذى مع إعادة الزرع بشكل منتظم كل فترة مع الحفظ فى الثلاجة.

Table 14.1 Maintenance of Bacteria

Bacterium	Maintenance Media*	Storage Temperature (°C)	Storage Time (Months)
Aerobacter	1,2	4–10	2
Alcaligenes	1,2	4–10	3
Bacillus	1,2	4–10	12
Clostridium	3,4	25	12
Escherichia	1,2	4–10	3
Lactobacillus	4	25	1
Leuconostoc	4	25	1
Neisseria (saprophytic)	2,5	25	1
Proteus	1,2	4–10	3
Pseudomonas	1,2	4–10	3
Salmonella	1,2	4–10	3
Serratia	1,2	4–10	3
Staphylococcus	1,2,4,5	4–10	3
Streptococcus	3,4,5	25	1–3

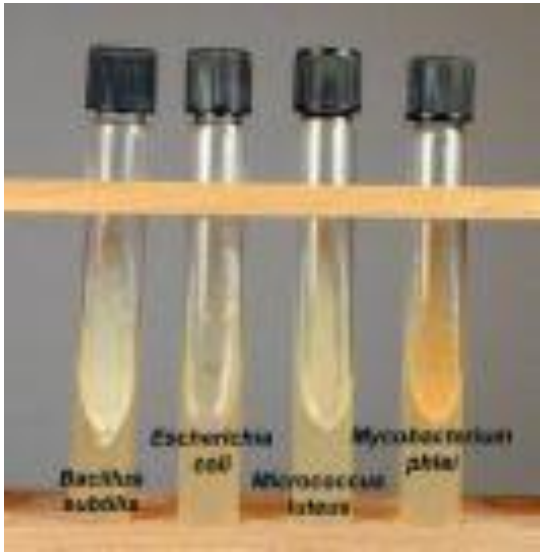
*Maintenance media employed: (1) nutrient agar, (2) tryptic soy agar, (3) cooked meat medium, (4) thioglycollate medium with $CaCO_3$, and (5) CTA medium (BBL).

(تابع) طرق حفظ المزارع البكتيرية Maintenance

2- تغطية المزارع بطبقة من الزيت المعدنى المعقم لمنع الجفاف ولخض النشاط ثم الحفظ بالتبريد .

3- التجفيد وهو شائع الإستخدام لسهولته وللثبات الذى يتيحه للمزرعة بالمقارنة بالطرق السابقة ولكن هذه الطريقة مكلفة .

4- الحفظ فى النيتروجين السائل تحت درجات حرارة منخفضة جداً من 70- إلى 196-.



**** ملحوظة:**

- بدلا من استعمال الأنابيب الزجاجية العادية يمكن إستخدام أنابيب بغطاء بلاستيك محوى لمنع التلوث ولمنع الجفاف تسمى أنابيب سكرو scroo

Maintenance طرق حفظ المزارع البكتيرية

بعد عزل الميكروبات فى مزارع نقية يجب المحافظة عليها لأطول فترة ممكنة بإحدى الطرق التالية:

1- الحفظ بالنقل الدوري Preservation by Periodic Transfer

وفيها تتم التنمية على بيئة الأجار المغذى مع إعادة الزرع بشكل منتظم كل فترة مع الحفظ فى الثلاجة.

Table 14.1 Maintenance of Bacteria

Bacterium	Maintenance Media*	Storage Temperature (°C)	Storage Time (Months)
Aerobacter	1,2	4–10	2
Alcaligenes	1,2	4–10	3
Bacillus	1,2	4–10	12
Clostridium	3,4	25	12
Escherichia	1,2	4–10	3
Lactobacillus	4	25	1
Leuconostoc	4	25	1
Neisseria (saprophytic)	2,5	25	1
Proteus	1,2	4–10	3
Pseudomonas	1,2	4–10	3
Salmonella	1,2	4–10	3
Serratia	1,2	4–10	3
Staphylococcus	1,2,4,5	4–10	3
Streptococcus	3,4,5	25	1–3

*Maintenance media employed: (1) nutrient agar, (2) tryptic soy agar, (3) cooked meat medium, (4) thioglycollate medium with $CaCO_3$, and (5) CTA medium (BBL).

طرق حفظ المزارع البكتيرية Maintenance

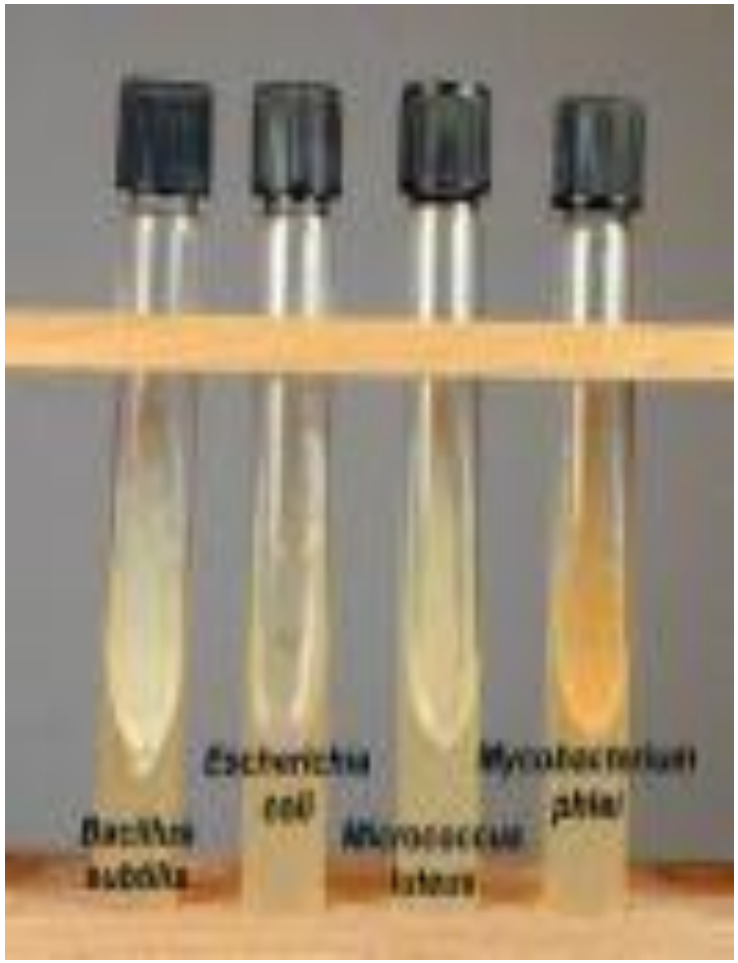
تستعمل فى العادة بيئة الأجار المغذى لحفظ معظم أنواع الميكروبات فى الثلاجة العادية

** ملحوظة:

-بدلا من استعمال الأنابيب الزجاجية العادية يمكن إستخدام أنابيب بغطاء بلاستيك محوى لمنع التلوث ولمنع الجفاف تسمى أنابيب سكرو scroo.

- يفضل نشر اللقاح على البيئة المائلة فى شكل خط متعرض لإنتاج كمية كبيرة من النمو.

مميزات الحفظ في أنابيب البيئات المائلة



1-فرص التلوث في الأنابيب أقل لقلة الهواء بالمقارنة بالأطباق.

2-سهولة التداول والنقل وتشغل مساحة أقل عند الحفظ أو التخزين فى الثلاجة.

3- جفاف البيئة في الأنابيب أقل من جفافها في أطباق بتري.

Maintenance (تابع) طرق حفظ المزارع البكتيرية

2الحفظ في الزيت المعدني Preservation under Minerial Oil

وفيها يتم تغطية المزارع بطبقة من الزيت المعدنى المعقم لمنع الجفاف ولخفض النشاط ثم الحفظ بالتبريد.

الحفظ بالتجفيد Preservation by Lyophilization

3- التجفيد شائع الإستخدام لسهولته وللثبات الذى يتيحه للمزرعة بالمقارنة بالطرق السابقة ولكن هذه الطريقة مكلفة .

الحفظ في النيتروجين السائل Preservation in Liquid Nitrogen

4- الحفظ فى النيتروجين السائل تحت درجات حرارة منخفضة جداً من -70 إلى -196.

طرق حفظ أخرى:

- **الحفظ في الماء Preservation in Water**
- **الحفظ في السيليكا جيل Preservation in Silica Gel**
- **الحفظ بالتجميد Preservation by Deep Freezing**
- **الحفظ باستخدام التربة المعقمة Sterilized soil**

(تابع) طرق حفظ المزارع البكتيرية Maintenance

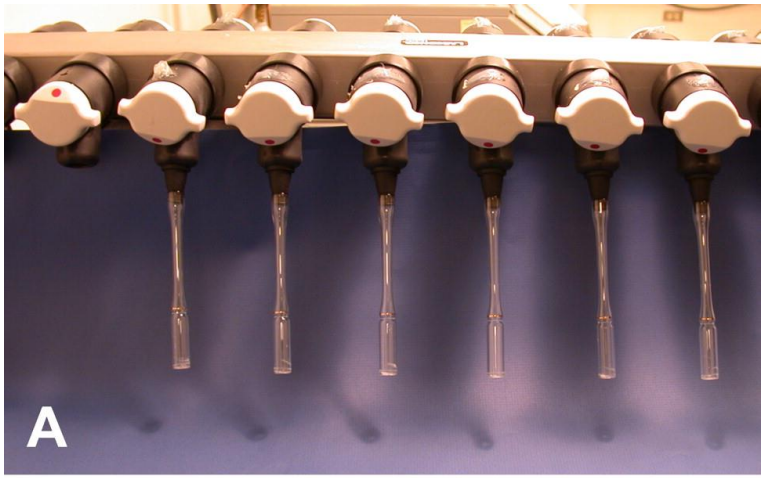
يمكن تقسيم طرق حفظ الميكروبات إلى طرق حفظ لفترات قصيرة وطرق أخرى لحفظ الميكروبات لفترات طويلة ومنها طريقة الحفظ باستخدام التجفيد Lypholization : وتتم عملية التجفيد باستخدام جهاز (Lypholizer) حيث يوضع الميكروب في أنابيب ذات فوهة كبيرة في الجهاز, ثم يتم سحب الماء تدريجيا تحت التبريد الشديد. في النهاية نحصل على الميكروب في صورة بودر.

(a)

(b)

(c)

شكل جهاز (Lypholizer)



أسئلة:

1- بماذا تعلل وضع أطباق بترى المحتوية على المزارع البكتيرية مقلوبة فى الحضان طوال فترة الحضانة؟

عرف كل مما يأتى: التلقيح - الحضانة - المزرعة البكتيرية.

2- أذكر الفرق بين كل من:

أ- المزرعة الفردية والمزرعة المختلطة.

ب- مزارع الوخز ومزارع الإهتزاز.

3- أذكر خمسة فقط من الإحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل الحضان.

- أسئلة :
- 1- إذكر طرق عزل وتنقية البكتيريا فى صورة مزارع فردية.
- 2- إشرح الفكرة التى تعتمد عليها عملية عزل وتنفية الميكروبات ؟
- 3- تكلم الطرق المتبعة لحفظ المزارع البكتيرية.
- 4- ما هو الفرق بين المزرعة الفردية والمزرعة النقية .
- 5- أكتب لماذا تجرى التجارب المعملية فى مكررات .

References

Benson, H.J (2001). Microbiological Applications Lab Manual, 8th ed., The McGraw−Hill Companies, USA.

Halt, J.G.; N.R. Krieg; P.H.A. Sneath; J.T. Stanley and S.T. Williams (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. The 9th ed., Williams & Wilkins, Baltimore.

Harley, J.P and L.M. Prescott (2002). Laboratory Exercises in Microbiology. 5th ed., The McGraw−Hill Companies. USA.

Mirsal, I.A (2008). Soil Pollution, Origin, Monitoring and Remediation. 2nd ed., Springer-Verlag Berlin, Germany.

Norris, J.G.; and D.W. Ribbons (1969). Methods in Microbiology. Academic Press INC, London.

Pelczar, M.J.; Jr.E.C.S. Chan and N.R. Krieg (1993). Microbiology Concepts and Applications. 1st ed., McGraw-Hill, Inc. USA.

Rogers, P.H. (1993). Bacterial Cell Structure. 1st ed., Van Nostrand Reinhold (UK) Co., Ltd. England.

Singleton, P (1997). Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine, 4th ed., John Wiley & Sons Ltd, England.

Walstra, P.; T.J. Geurts; A. Noomen; A. Jellema and M.A.J.S van Moekel (2005). Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes. 1st ed., Marcel Dekker, Inc. USA.

أعضاء هيئة التدريس بقسم الميكروبيولوجيا الزراعية (1999). مذكرات فى الميكروبيولوجيا الزراعية العملية - قسم الميكروبيولوجيا الزراعية – كلية الزراعة – جامعة المنصورة – مصر.

حسين عبد الله محمد الفضالى (2007). الميكروبيولوجيا العامة – الطبعة الأولى - مكتبة نانسى - دمياط الجديدة – مصر.

حسين عبد الله محمد الفضالى (2008). تدريبات عملية فى الميكروبيولوجيا العامة – الطبعة الأولى - مكتبة نانسى - دمياط الجديدة – مصر.

حسين عبد الله محمد الفضالى (2008). ميكروبيولوجيا التربة الزراعية – الطبعة الأولى - مكتبة نانسى - دمياط الجديدة – مصر.

سعد على زكى محمود (1988). الميكروبيولوجيا التطبيقية العملية – مكتبة الأنجلو المصرية – شارع محمد فريد – القاهرة – مصر.

سعد على زكى محمود وعبد الوهاب محمد عبد الحافظ ومحمد الصاوى مبارك (1980). ميكروبيولوجيا الأراضى . مكتبة الأنجلو المصرية – ش محمد فريد – القاهرة.

الشحات محمد رمضان طه وراوية فتحى جمال (2005). ميكروبيولوجيا التخمرات . دار الفكر العربى . الطبعة الأولى . المكتبة العصرية . المنصورة . مصر.

فتحى اسماعيل حوقة وسامية مرسى بيومى وشريف محمد القاضى (2010). تلوث البيئة إلى أين . المكتبة العصرية - المنصورة – مصر.

فتحي إسماعيل علي حوقه وتوفيق سعد محمد شادى (2004). الأسمدة الحيوية ودورها فى حماية البيئة وسلامة الغذاء . الطبعة الأولى . المكتبة العصرية . المنصورة . مصر.

محمود محمد عوض الله السواح (2002). الإنزيمات الميكروبية . المكتبة العصرية . الطبعة الأولى . المنصورة.

محمود محمد عوض الله السواح (2003). إستراتيجيات التحولات الحيوية . المكتبة العصرية . المنصورة.

محمود محمد عوض الله السواح (2003). البيوتكنولوجيا والميكروبات. المكتبة العصرية . المنصورة.

محمود محمد عوض الله السواح وآخرون (2002). الميكروبيولوجيا العامة العملية . الطبعة الأولى . المكتبة العصرية . المنصورة.

محمود محمد عوض الله السواح وإيمان حسين عاشور يوسف (2002). الميكروبيولوجيا العامة . المكتبة العصرية . الطبعة الأولى . المنصورة.

مصطفى كمال أبو الدهب ومحمد عبد القادر الجعرانى (1984) . البكتيريا - الجزء الثانى - التمارين المعملية الأساسية - الطبعة الثانية – دار المعارف – الإسكندرية – مصر.

مصطفى كمال أبو الدهب ومحمد عبد القادر الجعرانى (1984) . البكتيريا . دار المعارف – القاهرة – الطبعة الثانية.

http://www.mans.edu.eg/heepf/daac/
http://www.mhhe.com/prescott5
http://www.sterilizers.com/