الفصل الثاني

سائل الكرش

أولاً : بروتوزوا الكرش :

١ ـ فصل هدبيات الكرش من محتويات الكرش :

تطرد محتويات الكرش مركزيا ٣ دقائق ، ويزال معظم الرائق . أضف ١٠ مل من الراسب إلى ٤٠ مل محلول سكروز ٣٠٪ في أنبوبة اختبار سعة ٥٠ مل ، اطرد مركزيا ٣ دقائق ثم يزال الرائق . اغسل الراسب المحتوي على الهدبيات بالطرد المركزي ٣ مرات × ٥ دقائق مع محلول كلوريد صوديوم ٠,٩ ٪ .

٢ ـ صبغ وتثبيت هدبيات الكرش للميكروسكوب :

أ ـ محلول ملح ـ فورمالين ـ أخضر ميثيل (MFS) مفيد جداً للتعرف على الهدبيات ويتكون من :

١٠٠ مل فورمالين ٣٥٪ .

٩٠٠ مل ماء مقطراً .

٠,٦ جم أخضر ميثيل .

٨,٠ جم كلوريد صوديوم .

ويبدو لونه أخضر غامقاً ، ويخزن في مكان مظلم ، وإلا يتحول من أخضر ميثيل إلى بنفسجي ميثيل أقل قدرة على الصبغ . عند إضافة العينة بمقدار ٥–١٠ أضعاف حجم محلول MFS فإنه يصبغ فقط أنوية الهدبيات . وتفحص العينة بعد ٣٠ دقيقة على الأقل من إضافة محلول MFS ، حيث إن قبل ذلك تكون الصبغة ضعيفة . العينات المصبوغة بهذا المحلول والموضوعة في ظلام تظل صالحة لمدة ٣ سنوات على الأقل . والمحلول ذاته يمكن حفظه طويلاً .

ب ـ محلول ملح ـ فورمالين ـ أزرق تريبان (TBFS) يستخدم لتمييز الهدبيات الحية عن الميتة في الكرش ، ويتكون هذا المحلول الأزرق الداكن من :

١٠٠ مل فورمالين ٣٥٪ .

٩٠٠ مل ماء مقطراً .

٢ جم أزرق تريبان .

٨ جم كلوريد صوديوم .

وعند إضافة العينة بمقدار ٥-١٠ أضعاف حجم محلول TBFS تتلون أنوية الكائنات الحية بلون أزرق فاتح ، بينما باقي أجزاء الجسم لا تتلون أو تتلون قليلاً جداً ، أجسام الكائنات الميتة تتلون بلون أزرق داكن ؛ لذا يجب فحص العينة سريعاً في ظرف يومين من التثبيت . والمحلول ذاته يحفظ طويلاً .

٣ ـ عد الهدبيات :

يعبر عن عدد هدبيات الكرش عامة كعدد / مل محتويات كرش . ولما كانت التصفية تقلل عدد الهدبيات ، فإنه يفضل العدّ بدون معاملة للعينة ، أو على أقصى تقدير تصفي خلال طبقة واحدة من الشاش . وأفضل العينات لعد الهدبيات هي المعاملة بمحلول MFS . ويجرى العدّ باستخدام شرائح عدّ بلانكتون أو هيموسيتوميتر . تخلط العينة المخففة جيدا ، وتسحب بماصة ١ مل مدرجة ، يوضع منها ٠,١ مل على أخاديد شريحة عد البلانكتون (التي تتباعد عن بعضها بمسافة ٠,٥ مم) . غط بغطاء شريحة . عدّ أسفل ميكروسكوب بتكبير × ١٥٠ أو × ٢٠٠ . تعد العينة على ١٠ أقسام فيما بين خطين ، مع عد الهدبيات التي على الأخاديد لليمين أو لليسار فقط . احسب عدد الهدبيات/ مل محتويات كرش من المعادلة :

ع = ٧٢ × ت × م .

حيث ع = عد الهدبيات / مل سائل كرش .

ت = تعداد الهدبيات في ١٠ أقسام من شريحة عد البلانكتون .

م = معامل تخفيف العينة .

وقد تعد بروتوزوا سائل الكرش بأخذ ١ مل من عصير الكرش مع ٢ مل محلول فورمالدهيد ١٠ ٪ (الذي يحتوي ٣٠ مل جليسرين + ٣٠ مجم أخضر ميثيل لكل ١٠٠ مل) مع ٢ مل محلول جليسرين مخفف (٣٠٪) ، فيكون المحلول الأصلي قد خفف بنسبة ١ : ٥ . وباستخدام شريحة العد Fuchs - Rosenthal حجم فراغات العد بها ١ × ١ × ٠,٢ مم٣ وتحت ميكروسكوب وبقوة تكبير × ٣٢٠ تعد البروتوزوا .

ثانيًا : بكتيريا الكرش :

١ ـ جمع العينة وتجهيزها : تجمع عينات الكرش عقب الوفاة مباشرة ، أو من فتحة مستديمة في كرش المجترات الحية . وللفحص الميكروسكوبي تثبت العينة بدون تأخير بواسطة فورمالين ١٠ ٪ أو محلول MFS كما في بروتوزوا الكرش .

٢ ـ العدّ الميكروسكوبي : تمسح شريحة زجاجية بمحلول مخفف (٠,٠١ مل)

٣١٠–٥١٠ مرة من عينة محتويات الكرش . جفف الشريحة هوائيا ، وثبتها بالحرارة ، ثم اصبغها بصبغة جرام . عدّ على الأقل ١٠٠ خلية بكتيرية أو ١٠ حقول ميكروسكوبية ، واعتبر السلاسل أو الأزواج على أنها أفراد خلوية. احسب متوسط عدد البكتيريا في الحقل، احسب متوسط عدد البكتيريا في العينة / جم =

(متوسط العدد في الحقل) × (عدد الحقول/ سم^{٢} (٧,٠٩ × ١٠^{٣}) × (التخفيف (١٠)^{٣}) × (١٠^{٢})(٠,٠٠١ مل).

وتحضر صبغة جرام بإذابة ١٠ جم Crystal Violet في لتر ماء مقطر ، وإذابة ٥٠ جم بيكربونات صوديوم في لتر ماء ، وإذابة ٤ جم صودا كاوية في ٢٥ مل ماء و ٢٠ جم يود + ١ جم يوديد بوتاسيوم في ٩٧٥ مل ماء مقطر ، اخلط ٣٠٠ مل أسيتون مع ٧٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥٪ ، أذب ٢٠ جم سافرانين فى كحول إيثايل ٩٥ ٪ وأكمل إلى لتر بالماء المقطر ، وهكذا تنتج صبغة جرام من هذه المحاليل مجتمعة طبقا لتطوير Kopeloff .

ويمكن الرجوع إلى المرجع :

- Ogimoto , K .& Imai , S. (1981) Atlas of Rumen Microbiology . Japan Scientific Societies Press , Tokyo .