

الفصل الثاني

سائل الكرش

أولاً : بروتوزوا الكرش :

١ - فصل هدييات الكرش من محتويات الكرش :

تطرد محتويات الكرش مركزياً ٣ دقائق ، ويزال معظم الرائق . أضف ١٠ مل من الراسب إلى ٤٠ مل محلول سكرز ٣٠٪ في أنبوبة اختبار سعة ٥٠ مل ، اطرد مركزياً ٣ دقائق ثم يزال الرائق . اغسل الراسب المحتوي على الهديات بالطرد المركزي ٣ مرات $5 \times$ دقائق مع محلول كلوريد صوديوم ٩ ، ٠ ، ٩٪ .

٢ - صبغ وتثبيت هدييات الكرش للميكروسكوب :

أ - محلول ملح - فورمالين - أخضر ميثيل (MFS) مفيد جداً للتعرف على الهديات 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 الهديات . 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 - محلول ملح - فورمالين - أزرق تريان (TBFS) يستخدم لتمييز الهديات الحية عن الميتة في الكرش ، ويتكون هذا المحلول الأزرق الداكن من :

١٠٠ مل فورمالين ٣٥٪ .

٩٠٠ مل ماء مقطراً .

٢ جم أزرق تريان .

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 يومية من الشبث . والمحلول ذاته يحفظ طويلاً .

٣ - عد الهدديات :

يعبر عن عدد هديات الكرش عامة كعدد / مل محتويات كرش . ولما كانت التصفية تقلل عدد الهدديات ، فإنه يفضل العدّ بدون معاملة للعينة ، أو على أقصى تقدير تصفي خلال طبقة واحدة من الشاش . وأفضل العينات لعد الهدديات هي المعاملة بمحلول MFS . ويجرى العدّ باستخدام شرائح عدّ بلانكتون أو هيموسيتوميتر . تخلط العينة المخففة جيداً ، وتسحب بماصة ١ مل مدرجة ، يوضع منها ١,٠ مل على أخاديد شريحة عدّ البلانكتون (التي تتباعد عن بعضها بمسافة ٠,٥ م) . غط بغطاء شريحة . عدّ أسفل ميكروسكوب بتكبير $150 \times$ أو $200 \times$. تعد العينة على ١٠ أقسام فيما بين خطين ، مع عد الهدديات التي على الأخاديد لليمين أو لليسار فقط . احسب عدد الهدديات / مل محتويات كرش من المعادلة :

$$ع = ٧٢ \times ت \times م$$

حيث ع = عدد الهدديات / مل سائل كرش .

ت = تعداد الهدديات في ١٠ أقسام من شريحة عدّ 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 العدّ Fuchs - Rosenthal حجم فراغات العدّ بها $1 \times 1 \times ٢$ م، ٢ وتحت ميكروسكوب بقوة تكبير $320 \times$ تعد البروتوزوا .

ثانياً : بكتيريا الكرش :

١ - 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 - 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) × (١٠) × (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 في 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 .

obeikandi.com