V-1 الأجهزة المستعملة :

جهاز الاستخلاص	جهاز قياس الضوء الطيفي
ميزان إلكتروني	حمام مائي كهربائي
موقد بنزن	مسخن خاص بالحوجلة
مقياس نصف القطر	فرن للتجفيف
سخان كهربائي	معقم
مبخر دوار	

V- 2الأدوات الكيميائية المستعملة :

أنابيب اختبار	حوجلات ذات سعات مختلفة	اجاصة
ورق ترشيح	كؤوس مختلطة الأحجام	سحاحة
ألينة ماير	بيشر	قمع
حامل أنابيب اختبار	مكثف	مخابر مدرجة
حجرة العينة	ماصات، ماصة باستر	علب بيتر ى
Cuvette	قارورات زجاجية	أقراص امتصاص

V- 3 وسط الزرع :

فقاعات مغذية	وسط هينتون MH (Mueller Hinton)
وسط الجيلوز	

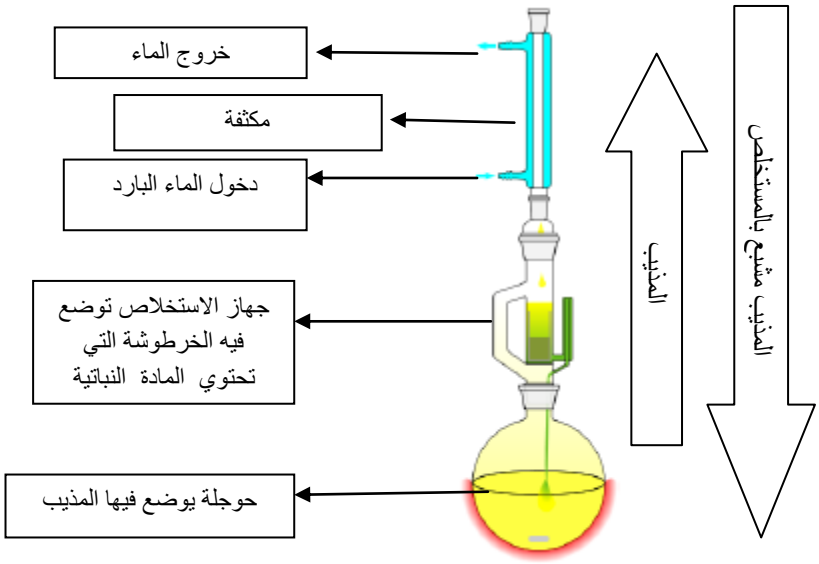
V- 4 المواد الكيميائية المستعملة :

حمض الغاليك	حمض كلور الماء المركز(HCl)	هيدروكسيد الصوديومNaOH
الكيرسيتين	($AlCl_3$) ثلاثي كلوريد الحديد	أسيتون (CH_3COCH_3)
ماء مقطر(H_2O)	اوكسالات الصوديوم ($Na_2C_2O_4$)	ايثانول ($RCOCH_3$)
ماء فسيولوجي	كلوريد الكالسيوم($CaCl_2 2H_2O$)	كلوروفورم ($CHCl_3$) (
أيثر(C_2H_5OH)	كلوريد الصوديوم (NaCl)	ميثانول (CH_3OH)
المغنزيوم (Mg)	حمض الكبريت (H_2SO_4) (	

V- 5 المحاليل المحضرة المستعملة:

محلول ($FeCl_3$) ذو تركيز 10%و 1%	محلول (Na_2CO_3) ذو تركيز 2%
محلول (HCl) ذو تركيز 4 % و 1%	محلول خلات الرصاص (CH_3COOPb) ذو التركيز 1%
محلول ($AlCl_3$) ذو تركيز 2%	محلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف (NaOH) ذو التركيز 0.064%

V- 6 طريقة عمل جهاز الاستخلاص



صورة - 7 مبدأ عمل جهاز الاستخلاص (Soxhlet)

V- 7 تحضير المادة النباتية :

* تمت زراعة نبات اليقطين في مدينة مسعد ،و تمت عملية جني الثمار في شهر ديسمبر.

وضعت الثمار في غرفة ذات تهوية جيدة و لا تتعرض للرطوبة و أشعة الشمس فوق الحد المطلوب 37°.

بعد جفاف العينات تم نزع البذور من الثمار و طحن الثمار بواسطة مطحنة كهربائية ، تم استخدام الثمار بكاملها قشرة و لب.تحصلنا علي مسحوق ناعم حفظ في علبة زجاجية معقمة و محكمة الغلق و حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال

الصورة 8 -ثمار نبات اليقطين الجافة

V- 8 تحضير المستخلص الكحول مائي لثمار اليقطين :

V- 9 طريقة العمل:

أجريت التجارب التالية في مخبر الماستر بالكلية

نأخذ 7غ من مسحوق الثمار نضعه في بيشر ،و نبلله قليلا بمحلول متكون من 30مل من الايثانول و 70مل من الماء المقطر،و ذلك لمنع تطاير الجزيئات الدقيقة من المسحوق ،حيث يمثل هذا المحلول المذيب الذي سنستخدمه.

* نضع المسحوق المبلل في كيس من القماش (الخرطوشة) و نضع المذيب المتبقي في الحوجلة.
* نضع الخرطوشة التي تحتوي علي المادة النباتية داخل جهاز الاستخلاص.
* نوصل جهاز الاستخلاص بالمكثف و الحامل المعدني و الحوجلة التي تحتوي علي المذيب و المسخن الخاص بالحوجلة.
* نشغل الجهاز و نكتب زمن البدء .

عندما يبدأ جهاز الاستخلاص في العمل نلاحظ حركة انتقال المذيب في جهاز الاستخلاص و تغير لونه و ذلك بسبب خروج المركبات الموجودة بداخل المادة النباتية .

بعد مدة من الزمن يعود المذيب للونه الأول و يظهر وجود مستخلص في الحوجلة.

عندها نوقف تشغيل الجهاز نكتب زمن التوقف ثم نقوم بحساب الزمن المستغرق للاستخلاص .

الوقت الذي يستغرقه جهاز الاستخلاص لصنع المستخلص المائي لثمار اليقطين هو 5 ساعات .

* نقوم بترشيح المحلول المتحصل عليه ثم نجففه في المبخر évaporateur rotatif . [14]

صورة9-كيفية تركيب جهاز الاستخلاص

صورة 10-المستخلص بعد نهاية عملية الاستخلاص

صورة 11- جهاز المبخر الدوار أثناء تجفيفه للمستخلص

صورة 12 –المستخلص

* نقوم بوزن الحوجلة المستعملة في عملية التجفيف قبل البدء ثم نعيد وزنها بعد الانتهاء.
* نقوم بطرح وزن الحوجلة و هي فارغة من حجمها و هي ممتلئة فنحصل علي وزن المستخلص الناتج.
* نقوم بتسخين 50مل من الماء المقطر ثم نفرغه علي المستخلص الموجود داخل الحوجلة و نتركه حتى يذوب.
* نضع المستخلص المتحصل عليه ذو الحجم 50مل في قارورة معقمة محكمة الغلق ونكتب عليه التاريخ و الحجم و نضعه في الثلاجة لحين الاستعمال. [14]

V- 9 -1 تحضير جرع المستخلص :

* مستخلص ذو التركيز 100% نترك المستخلص كما هو
* مستخلص ذو التركيز 50% نأخذ 5مل من المستخلص نضيف له 5مل محلول كلور الصوديوم
* مستخلص ذو التركيز 10% نخذ 1مل من المستخلص نضيف له 9مل محلول كلور الصوديوم
* محلول كلور الصوديوم ستأتي طريقة تحضيره لاحقا.

V- 10 -2الكشف الكيميائي عن أهم المركبات الفعالة في ثمار اليقطين:

V- 10 -2- 1 الكشف عن الصابونيات Saponine:

* نضع في أنبوب اختبار 400 مغ من مسحوق الثمار نضيف له 200 مغ من الماء المقطر .
* نسخن المحلول علي درجة °100c مع التحريك حتى الغليان .
* عند الغليان نحسب 15 دقيقة ثم نوقف التحريك و التسخين.
* نرشح المحلول ثم نأخذ منه 1.5مل نضعها في أنبوب اختبار و نظيف لها 13.5مل من الماء المقطر ثم نرج 5 ثواني.
* ظهور رغوة لمدة أكثر من 10 دقائق دليل علي الكشف الموجب . [14] [23] [25]

V- 10- 2- 2 الكشف عن المواد القابضة Les tannins :

طريقة 1 : [14] [25]

* نضع في أنبوب اختبار 100 مغ من مسحوق الثمار نظيف له 5 مل أو 4 مل من الكاشف B .
* نسخن المحلول في حمام مائي لمدة 5دقائق .
* ظهور اللون الأحمر أو تغير لون المحلول إلي الأحمر دليلا علي الكشف الموجب .

طريقة 2 : [18] [24]

* نضع في أنبوب اختبار 2.5 غ من مسحوق الثمار نظيف له 25 غ من الماء المقطر.
* نقوم بغلي المحلول ثم ترشيحه.
* نضيف له كمية من ($FeCl_3$) .
* ظهور لون اخضر مزرق أو اخضر مسود أو ازرق مسود دليل علي الكشف الموجب .

طريقة 3: [17]

* نحضر خلاصة نباتية و ذلك بوضع 3 غ من مسحوق الثمار نضيف له 120 مل من الماء المقطر، ثم نسخن المحلول تحت الدرجة المؤوية (50-40)c° لمدة (3-4)ساعات ، نرشح المحلول و نضع المستخلص المتحصل عليه في قارورة زجاجية، و نكتب عليه تاريخ و زمن التحضير و نسميه(المستخلص A) .
* نرشح المحلول ونأخذ من المستخلص 7مل نضعها في أنبوب اختبار و نضيف لها قطرات من خلات الرصاص 1% .
* ظهور راسب هلامي دليل علي الكشف الموجب

V- 10- 2- 3 الكشف عن القلويدات Alcaloïde :

نضع في أنبوب اختبار 100مغ من مسحوق الثمار نضيف له 10 مل من محلول (H_2SO_4 10%) نحرك لمدة 2دقيقة .

* نرشح المحلول بواسطة ورق الترشيح ثم نقسم الناتج إلي جزأين و نضع كل جزء في أنبوب اختبار .
* نضيف للأنبوب الأول قطرتين من كاشف بشارد .
* تشكل راسب عسلي دليل علي الكشف الموجب.
* نضيف للأنبوب الثاني قطرتين من كاشف دراجندروف .
* تشكل راسب برتقالي دليل علي الكشف الموجب. [14] [24]

V- 10- 2- 4 الكشف عن البوليفينول Poly phénols :

طريقة 1[14]

* نضع داخل أنبوب اختبار 2 مل من الماء المقطر نضيف لها 0.2 غ من مسحوق الثمار و نضيف لها 6 مل من الأسيتون .
* نسخن المحلول في حمام مائي تحت درجة 60° لمدة 5دقائق مع التحريك ثم نرشح المحلول و نقسمه إلي قسمين جزء نتركه كشاهد و الجزء الأخر نضيف له قطرتين من محلول($FeCl_3$ 10%) .
* تشكل راسب اخضر مسود دليل على الكشف الموجب. [14]

طريقة 2 [14]

* نأخذ من (المستخلص A) (7مل) نضيف لها قطرات من كاشف (Folin) phosphomolybdotungstique .
* ظهور لون اخضر مزرق دليل علي الكشف الموجب .

V- 10- 2- 5 الكشف عن الفلافونويدات Flavonoïde:

طريقة 1:[1]

* نضع في أنبوب اختبار 1غ من مسحوق الثمار نضيف له 15 مل من حمض الكلور (HCl 1%) .
* نضع المحلول في قارورة معقمة و محكمة الغلق نتركه لمدة 24سا.
* نرشح المحلول بعدها و نأخذ منه 10مل نضعها في أنبوب اختبار و نضيف لها (NH_4OH) حتى القاعدية و ذلك بوضع ورق (PHمتر) داخل الأنبوب و عند تغير لون الورقة من لون الوسط ألحامضي إلي لون الوسط القاعدي نوقف إضافة (NH_4OH) .
* ظهور لون اصفر فاتح يدل علي وجود الفلافونويدات. [1]

طريقة 2: [14] [23]

* نضع في أنبوب اختبار 0.3 غ من المسحوق نضيف لها 5 مل من الايثانول نسخن المحلول في حمام مائي علي درجة 65° لمدة 10دقائق .
* نرشح المحلول ثم نصيف له 1 مل من الماء المقطر و 1 مل من حمض الكلور المركز (HCl) و كمية قليلة جدا من (Mg) .
* نضع الأنبوب في إناء به ثلج و ذلك لان التفاعل ناشر للحرارة.
* ظهور لون احمر كلون فاكهة حب الملوك أو لون برتقالي أو لون بنفسجي دليل علي الكشف الموجب.

V- 10- 2- 6 الكشف عن الراتنجات Resins : [18]

* نضع في أنبوب اختبار 0.25غ من مسحوق الثمار نضيف له 2.5 مل من الميثانول 95% .
* نقوم بغلي المحلول لمدة 2دقيقة ثم نرشحه
* نضيف له 5 مل من الماء المقطر وكمية قليلة من حمض الكلور (HCl 4%) .
* تعكر المحلول دليل علي وجود الراتنجات. [18]

V- 10- 2- 7 الكشف عن الستيرولات و التربينات الثلاثية : [1] [23]

* نضع في أنبوب اختبار 5غ من مسحوق الثمار نضيف له 20مل من الكلوروفورم ($CHCl_3$) .
* نخلط المحلول جيدا ثم نرشحه.
* نضيف له 1مل من حمض الكبريت (H_2SO_4) .
* ظهور اللون الأخضر الذي يتحول إلي اللون الأحمر في نقطة تلاقي الطوران دليل علي الكشف الموجب.

V- 10- 2- 8 الكشف عن الكومارينات :

طريقة 1 :

* نقوم بوضع 3غ من مسحوق الثمار نضيف له 120 مل من الماء المقطر ثم نسخن المحلول تحت الدرجة المؤوية (50_40) لمدة (4_3)ساعة نرشح المحلول (نسميه المحلول A) ونأخذ منه 7مل نضعها في أنبوب اختبار .
* نعرض الأنبوب للأشعة فوق البنفسجية 365nm .
* ظهور اللون الأصفر المخضر علي الأنبوب دليل علي الكشف الموجب. [17] [24]

طريقة 2:

* نأخذ جزء من ورقة ترشيح و نبلله بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف (NaOH) .
* نأخذ 7مل من **(المحلول A)** نضعها في أنبوب اختبار و نغطيه بورقة الترشيح المبللة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم المخفف ،ثم نضعه في حمام مائي و نتركه حتى تبدأ الخلاصة النباتية في التبخر.
* ننزع ورقة الترشيح المبللة ب هيدروكسيد الصوديوم و بخار الخلاصة النباتية و نقوم بتجفيفها .
* نعرضها إلي الأشعة فوق البنفسجية تحت طول الموجة 365nm .
* ظهور اللون الأصفر المخضر دليل علي الكشف الموجب. [17]

V- 10- 2- 9 الكشف عن الزيوت الطيارة : [17] [24]

طريقة 1 :

* نضع كمية من (المستخلص A) التي قمنا بتحضيرها في أنبوب اختبار .
* نعرض ذلك الأنبوب إلي الأشعة فوق بنفسجية علي طول الموجة 365nm.
* ظهور اللون الرمادي دليل علي الكشف الموجب .

طريقة 2:

* نبلل قطعة من ورق الترشيح بالخلاصة النباتية ثم نجففها و نعرضها إلي الأشعة فوق البنفسجية.
* ظهور بقعة رمادية علي الورقة دليل علي الكشف الموجب علي طول الموجة 365nm .

V- 10- 2- 10 الكشف عن السكريات: [18] [23]

* نقوم بوضع كمية من المستخلص A في أنبوب اختبار .
* نظيف للأنبوب مزيج متساوي من محلول فهلنك A + محلول فهلنكB .
* ظهور اللون الأحمر دليل علي الكشف الموجب .

V-11 ملاحظة:نعيد جميع الكشوف السابقة ولكن باستخدام المستخلص الذي تحصلنا عليه باستخدام جهاز الاستخلاص(Soxhlet) .

V- 12 التقدير الكمي للبوليفينول :

V– 12 - 1 طريقة القيام بالتجريب : [14] [28] [23]

قبل القيام بالتجربة يجب القيام بما يلي :

نأخذ من الكاشف Folin-Ciocalleu 3 مل و نضيف لها 7 مل من الماء المقطر .

نقوم بإذابة 2غ من بيكاربونات الصوديوم Na_2CO_3 في 3 مل من الماء المقطر .

نضع في حوجلة 0.001غ من حمض الغاليك نضيف لها 50 مل من الماء المقطر .

نقوم بترقيم 10 أنابيب اختبار من 1 إلي 10 و نغلفها بورق الألمنيوم لمنع تعرضها للضوء نضع في الأنبوب الأول 1مل من محلول حمض الغاليك و كمية من الماء .

الجدول 12 - تركيز حمض الغاليك المستخدم

حجم المحلول الأم(مل)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
حجم الماء المقطر (مل)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
حجم حمض الغاليك (مغ / مل)	0.02	0.04	0 .06	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.2

* نأخذ من الأنبوب الأول حجم 0.1 مل نضعها في حجرة العينة نضيف 0.25 مل من كاشف (Folin)و 0.4 مل من الماء المقطر نترك المحلول لمدة 2 دقيقة ثم نضيف 1.25 مل من بكربونات الصوديوم (Na_2CO_3) ذو التركيز2% ونتركه 40دقيقة .
* نقوم بتحضير الشاهد حيث نضع في حجرة العينة 0.5 مل من الماء المقطر نضيف لها 0.25 مل من كاشف (Folin) و نترك المحلول لمدة 2 دقيقة ثم نضيف لها 1.25مل من بكربونات الصوديوم (Na_2CO_3) .

- **طريقة العمل باستخدام المستخلص :**

* نضع في حجرة العينة 0.1 مل من المستخلص المائي للثمار نضيف له 0،4 مل من الماء المقطر و 0.25 مل من كاشف (Folin-Cicalleu) بعد مرور 2 دقيقة نضيف 1.25 مل من بكربونات الصوديوم (Na_2CO_3) .
* نخلط المحلول جيدا و نتركه مدة 40دقيقة بعيدا عن الضوء.
* نعيد نفس العملية السابقة باستخدام الشاهد السابق .

فنحصل علي النتائج التالية :

النتائج قبل إضافة المستخلص المائي للثمار :

الجدول 13 - قيم الامتصاصية لحمض الغاليك قبل إضافة المستخلص

الأنبوب	الامتصاصية (nm)		
1	0.092	0.138	0.183
2	0.134	0.135	0.316
3	0.225	0.114	0.116
4	0.238	0.331	0.039
5	0.459	0.461	0.466

6	0.616	0.621	0.630
7	0.566	0.583	0.514
8	0.670	0.011	0.513
9	0.701	0.156	0.185
10	1.020	0.568	1.517

النتائج بعد إضافة المستخلص المائي للثمار :

الجدول 14 - قيم الامتصاصية لحمض الغاليك بعد إضافة المستخلص

الأنبوب	الامتصاصية (nm)		
1	0.137	0.117	0.151
2	0.116	0.113	0.150
3	0.119	1.126	1.129

- نترجم النتائج المتحصل عليها في المنحني الموضح في الملحق .

- نقوم باستخراج كمية البوليفينول بأخذ القيمة المتوسطة للامتصاصية و إسقاطها في المنحني المتحصل عليه

V– 13 التقدير الكمي للفلافونويدات :

_تحضير مجموعة من التراكيز المختلفة للكيرسيتين .

كما هو موضح في الجدول التالي : [1] [28] [51]

الجدول 15- تركيز حمض الكيرسيتين المستخدم

حجم المحلول الأم (مل)	0.1	0.2	0.4	0.8	1.1	1.5	1.8	2.3	2.6	3.0
حجم الماء المقطر(مل)	2.9	2.8	2.6	2.2	1.9	1.5	1.2	0.7	0.4	0
تركيز الكيرسيتين Qµg/ مل	0	2.5	5.0	10	15	20	25	30	35	40

V– 13 - 1 طريقة العمل

- **تحضير الشاهد و ضبط الجهاز :**
- **ضبط الجهاز :**نضبط الجهاز علي طول الموجة 430nm .
- **تحضير الشاهد منظم الجهاز :** نضع في أنبوب اختبار 1مل من الماء المقطر نضيف له 1 مل من كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) ذو التركيز2% .

طريقة العمل باستخدام المستخلص:

* نضع في أنبوب اختبار 1.5 مل من المستخلص المائي للثمار و نضيف له 1.5 مل من الماء المقطر
* نقسم الكمية المتحصل عليها إلي ثلاث أنابيب اختبار في كل أنبوب 1مل
* نضيف لكل أنبوب 1مل من كلوريد الألمنيوم ($AlCl_3$) .
* نترك الأنابيب الثلاثة 1دقيقة حيث لا تكون معرضة للضوء.
* ندخل الشاهد داخل الجهاز ثم نضغط علي 0 و نخرجه ثم ندخل حجرة عينة المحلول.
* نلاحظ تغير القيم و عند ثباتها نكتب القيمة و نخرج حجرة العينة.
* نعيد العملية للأنبوب الثاني و الثالث و نكرر العملية ثلاث مرات لكل أنبوب.

	الشاهد	العينة
المستخلص	–	1
$AlCl_3$	1	1
حجم الماء	1	–
الحجم الكلي	2	2

النتائج قبل إضافة المستخلص :

الجدول 15 - قيم الامتصاصية لحمض الكيرسيتين قبل إضافة المستخلص

الأنبوب	الامتصاصية (nm)		
1	0	0	0
2	0.131	1.33	0.027
3	0.146	3.236	0.122
4	0.309	0.317	0.328
5	0.319	0.794	0.775
6	1.23	1.113	0.858
7	1.27	1.26	0.912
8	1.31	1.42	1.550
9	2.28	0.980	1.98
10	3.10	1.907	2.01

النتائج بعد إضافة المستخلص :

الجدول 16 - قيم الامتصاصية لحمض الكيرسيتين بعد إضافة المستخلص

الأنبوب	الامتصاصية(nm)		
1	0.910	1.09	1.20
2	0.854	1.02	1.00
3	0.807	1.01	1.10

* نلخص النتائج في المنحني الموضح في الملحق.

V- 14التطبيقات البيولوجية:

V- 14 تقييم الفعالية المضادة لتبلور حصى الكلي : [32]

V- 14- 1تحضير المحاليل المستخدمة :

تحضير المحلول الأم (محلول كلوريد الصوديوم NaCl) [NaCl] = 150mmol /L

- **تحضير المحاليل الأساسية:**

تحضير محلول كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2\ 2H_2O$)

$[CaCl_2 2H_2O]$ =30mmol/L

تحضير محلول اوكسالات الصوديوم ($Na_2C_2O_4$)

[$Na2C_2O_4$] = *10m mol/L*

- **تحضير المحاليل الثانوية :**

نحضرها بتخفيف المحاليل الأساسية بواسطة المحلول الأم كلوريد الصوديوم

تخفيف محلول كلوريد الكالسيوم:

$[CaCl_2 2H_2O]$=8mmol/L

تخفيف محلول اوكسالات الصوديوم :

[$Na2C_2O_4$]=1mmol/L

V- 14- 2 طريقة العمل بدون مثبط (المستخلص) : [18]

نضع في حجرة العينة 1.5 مل من كلوريد الكالسيوم المخفف.

ندخله للجهاز و نضغط علي الصفر نضيف له 1.5 مل من اوكسالات الصوديوم المخفف.

نبدأ في القياس حيث كلما تمر 30 ثانية نقوم بكتابة القيمة التي توافقها علي الجهاز.

نعيد العملية ثلاث مرات و تكون مدة القياس حوالي 7 دقائق.

V- 14- 3 طريقة العمل بوجود المثبط : [32]

نضع في حجرة العينة 1 مل من كلوريد الصوديوم المخفف نضيف لها 1 مل من المستخلص ذو التركيز 100%

ندخلها للجهاز و نضغط علي 0 ثم نضيف لها 1 مل من اوكسالات الكالسيوم .

و كل ما تمر 30 ثانية نقرا القيمة الموافقة.

نكرر العملية ثلاث مرات و يكون زمن القياس حوالي 7 دقائق.

نعيد نفس العملية السابقة و ذلك باستخدام المستخلص ذو التركيز 50% ثم باستخدام المستخلص ذو التركيز 10%

نقوم برسم منحني بياني باستخدام القيم المتحصل عليها.

V- 14-4 حساب معدل التثبيط:

$$I\%=[1-(P_{AI} / P_{SI})]\times 100$$ -

حيث:

P_{AI}= الميل في وجود المثبط

P_{SI}= الميل في غياب المثبط

V- 15 تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا: [1]

قمنا في هذه الدراسة بما يلي :

اختبار الفعالية البيولوجية للمستخلص المائي لثمار نبات اليقطين علي 4 أنواع من البكتيريا

V- 15 -1 البكتيريا المختبرة :

يوضح الجدول المقابل البكتيريا المختبرة و نوع gram الخاص بها : [1] [43] [25]

الجدول 17 - البكتيريا المختبرة و نوع gram الخاص بها

البكتيريا المدروسة	نوع غرام gram
E-Coli	–
Pseudomonas aeruginosa	–
Salmonella typhus	–
Staphylococcus aurous	+

V- 15 -2 الدراسة النوعية للفاعلية البيولوجية للمستخلص الكحول مائي لثمار نبات اليقطين ضد البكتيريا بطريقة الانتشار في وسط صلب :

V- 15 -3 طريقة العمل:

تبين هذه الطريقة فاعلية المستخلص المائي ضد البكتيريا بتركيز 5Mc farland هذه القيمة تقابل مجال التركيز (بكتيريا/مل) (10^7-10^8) المقاسة بواسطة جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية المرئية Spectrophotomètre UV -V

الأقراص الممتصة و المعقمة تبلل بكمية من المستخلص المائي و توضع داخل علبة بتري علي سطح الجيلوزي المحتوي علي البكتيريا المختبرة .

انتشار المادة المستخلصة في الوسط الجيلوزي تمنع نمو و تكاثر البكتيريا حول محيط القرص.

في حالة وجود منع لنمو البكتيريا تظهر حالة حلقة حول القرص (منطقة التثبيط).

قراءة النتائج تكون بعد وضع علب بتري في الحاضنة تحت درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة. [25] [1]

V– 15- 3 - 1 تحضير الطبقة الأولي للوسط الزراعي :

* نقوم بإذابة وسط Muleur-Hinton (MH) .
* نفرغ 15 مل من وسط (MH) في علب بتري ذات قطر 90 مليمتر ثم نتركه حتى يبرد و يتجمد علي سطح طاولة المخبر. [1] [43] [25]

V– 15- 3 - 2 تحضير المعلق البكتيري:

* نأخذ 3 إلي 5 مستعمرة بكتيرية بعيدة عن بعضها و معزولة و حديثة الزراعة 18-24 ساعة .
* نضعها في (5 إلي 6 ملل) ماء فسيولوجي معقم ثم نخلط جيدا بجهاز Vortex أول قراءة لتركيز المعلق البكتيري المصنوع تكون باستخدام جهاز Spectrophotomètre UV-v علي طول موجة 620nm ، حيث نقرا قيمة الامتصاصية 0،5Mc farland التي توافق تركيز المعلق البكتيري (مل/بكتيريا) (10^7_10^8) .
* إذا كانت القراءة علي الجهاز لا توافق القيمة المناسبة نخفف بالماء الفسيولوجي إذا كانت بزيادة، أو إضافة مستعمرات بكتيرية إذا كانت بالنقصان.
* نعيد العملية حتى الحصول علي القيمة المناسبة [1] [43] [25]

V– 15- 3 - 3 ملاحظة : لا يجب أن نستخدم المعلق البكتيري المصنوع بعد مرور 15 يوم علي صنعه.

V– 15- 3 - 4 تحضير الطبقة الثانية للوسط الزراعي :

* نقوم بتذويب وسط (MH) في حمام مائي تحت درجة حرارة 95°C .
* نقوم بخفض درجة الحرارة إلي 45°C .
* نقوم بوضع 50مل من الوسط الزراعي (MH) في قارورات معقمة و نقوم بزرع في كل وسط 200µ من كل جذمة (عينة) بكتيرية .
* نقوم بخلط القارورات جيدا .

* نفرغ بسرعة 5مل من محتوي كل قارورة في علب بتري المتضمنة للطبقة الأولي من الوسط الزراعي علي كل المساحة ثم نتركها تتجمد علي سطح طاولة المخبر [1] [25]

V– 15- 3 - 5 استخدام الأقراص (إضافة الأقراص) :

* باستخدام ملقط معقم نأخذ قرصا معقما و بطرف القرص نلمس المستخلص المائي للثمار فيتبلل القرص تلقائيا و ذلك لمدة (20دقيقة).
* ندخل القرص داخل علبة بتري و نضعه فوق سطح الجيلوزي.

- نترك العلب فوق سطح طاولة المخبر لمدة 30 دقيقة ثم نضعها بشكل مقلوب في الحاضنة تحت درجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة[1] .

V– 15-6 قراءة النتائج :

إذا كان قطر التثبيط اكبر من محيط القرص فان المستخلص المائي للثمار له فاعلية ضد البكتيريا .

وجود مساحة واضحة تحيط بالقرص نتيجة ايجابية و عدم و جودها نتيجة سلبية [26] [25]