الاحياء المجهرية

ا.م.د محمد عبد الاله محمد ، م.د نوار طلال حامد ، م.د ضحى جاسم محمد ، م.د رنا خالد احمد ، ا.م.د فوز عبد السلام خليل

التعقيم
Sterilization

الفصل الثاني

التعقيم : هو العملية التي تجرد من خلالها الجسم او المادة المراد تعقيهما من كافة انواع الحياة ومن الممكن تنفيذ هذه العملية عن طريق تعرض المادة المراد تعقيمها الى عوامل فيزياوية او كيمياوية قاتلة . والتعقيم عملية مطلقة وليست نسبية ، فهي اما ان تكون معقمة او لاتكون .

ان عملية التعقيم تعتبر من اهم العمليات التي تجرى في جميع مختبرات الاحياء المجهرية وذلك لاسباب عديدة منها :

١. منع الاصابة بالامراض (الانسان والحيوان والنبات) .
٢. منع تلف المواد الغذائية .
٣. منع تداخل احياء مجهرية في بعض الصناعات التي تعتمد على وجود نوع معين منها.
٤. منع تلوث المواد المستعملة في المختبرات التي تتعامل مع نوع واحد نقي من الاحياء المجهرية (كما في مختبرات البحوث ومختبرات التشخيص وغيرها) .

ومن الممكن اجراء عملية التعقيم بوسائل وتقنيات متنوعة للتخلص من الاحياء المجهرية من هذه الوسائل :

أ- الطرق الفيزياوية .
ب- الطرق الكيماوية .
جـ- الطرق الميكيانيكية .

أـ الطرق الفيزياوية وتشمل

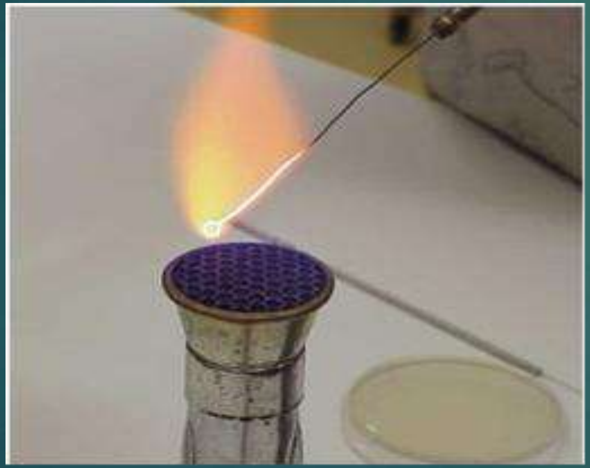
- ١ـ التعقيم بالحرارة .
- ٢ـ التعقيم بالاشعاع .
-
- ١ـ التعقيم بالحرارة ويتضمن :
- ١ـ التعقيم باستعمال الحرارة الجافة :
- وهي من اهم الطرق الشائعة الاستعمال والتي تتم بتعريض المواد المراد تعقيمها للحرارة وذلك للقضاء على الاحياء المجهرية وسبوراتها ويشمل التعقيم بالحرارة الجافة ما يلي :

التعقيم باللهب المباشر :

يتم ذلك بواسطة مصباح بنزن ويستعمل في تعقيم ابر التلقيح وفوهات مزارع الاحياء الدقيقة

والشرائح الزجاجية .

صور رقم (٢) التعقيم باللهب المباشر



التلهيب الكحولي : وهي عملية تعريض او غمر الادوات المعدنية بالكحول بتركيز ٧٠% وحرقها بلهب بنزن بعد ذلك وتستخدم هذه الطريقة لتعقيم

الادوات المعدنية مثل المقصات والملاقط والشفرات .

صورة رقم (٣)

التعقيم بالتلهيب الكحولي

أ- **التعقيم بالهواء الساخن** : تستعمل هذه الطريقة في تعقيم الادوات الزجاجية التي تطلب بحالة جافة مثل اطباق بتري وزجاجيات العينات والدوارق والانابيب والماصات البكتيرية وغيرها . تصل درجة حرارة جهاز التعقيم بالهواء الساخن (الفرن Oven) الى ١٦٠-١٨٠م وذلك لمدة ١-٣ ساعات ، تعقم الاطباق والماصات في علب خاصة من الالمنيوم و الصلب غير القابل للصدا او النحاس وبعد التعقيم تحفظ هذه العلب في اماكن تمنع تلوث هذه الادوات .

صورة رقم (٤) فرن الهواء الساخن

الاحتياطات التي تراعي عند اجراء هذه الطريقة :

١. يجب ان تكون الادوات الزجاجية غير مبللة .
٢. اذا كانت الادوات ملفوفة بورق او مغطاة بسدادات قطنية يجب ان لا تزيد درجة الحرارة عن ١٦٠م .
٣- وضع الادوات مرتبة في الجهاز قبل التسخين .
٤- وضع الادوات بطريقة تساعد على مرور التيارات الهوائية الساخنة .
٥- عدم فتح الجهاز الا بعد انخفاض درجة الحرارة الى درجة مقاربة لدرجة حرارة الجو .

- **التعقيم بالحرارة الرطبة**

أ- التعقيم بالبخار المتقطع

يستعمل لهذا الغرض كثير من الاجهزة منها جهاز Arnold Sterilizer وتعقم بهذه الطريقة المواد التي تتلف او تتغير خواصها الطبيعية والكيمياوية عند تسخينها الى درجة حرارة اعلى من ١٠٠م مثل وسط الحليب والجيلاتين المغذي والاوساط المحتوية على بعض السكريات والمصل . وفي هذه الطريقة يعرض الوسط الغذائي الى درجة حرارة ١٠٠م لمدة (٣٠-٤٠) دقيقة لمدة ٣ ايام متتالية وتسمى هذه الطريقة بالتندلة (Tyndalization) .

صورة رقم (٥) جهاز ارنولد (التعقيم بالبخار المتقطع)

ان اساس هذه الطريقة هو ان التعريض الاول للبخار يقتل كل الخلايا الخضرية ثم يترك الوسط لمدة ٢٤ ساعة بالحاضنة تحت درجة حرارة ٣٧م حيث تتحول السبورات (Spores) الى الخلايا وتقتل في التعريض الثاني عند درجة ١٠٠م وتحضن بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة ايضا اما التسخين في اليوم الثالث فهو لضمان قتل كافة الاحياء المجهرية .

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل جهاز ارنولد :

١. وضع كمية كافية من الماء لتوليد البخار .
٢. حساب الزمن اللازم بعد وصول درجة الحرارة الى ١٠٠م وليس بدء تشغيل الجهاز.
٣. اخراج الاوساط من الجهاز بعد انتهاء المدة اللازمة مباشرة .
٤. يجب ان تكون المادة المعقمة مادة غذائية كالاوساط وان تكون السدادة تسمح بمرور البخار الى الداخل.

ب- التعقيم بالبخار تحت الضغط .

يستعمل للتعقيم بهذه الطريقة جهاز الاوتوكليف (Autoclave) الذي يعمل كقدر كاتم ، ومن المعروف ان الحرارة الرطبة لها اثر اكبر في قتل الاحياء المجهرية من الحرارة الجافة وتستعمل هذه الطريق لتعقيم معظم الاوساط البكتريولوجية التي لا تتلف عند تعرضها لدرجات الحرارة العالية (اعلى من ١٠٠م) . وكذلك تعقيم الادوات الجراحية والسدادات الفلينية وفي ابادة المزارع البكتيرية وتعتمد هذه الطريقة على توليد البخار بكمية كبيرة في اناء قوي الجدران مصنوع من الصلب غير القابل للصداء Stainless steel او النحاس ويوجد في اسفل الجهاز مسخن كهربائي او غازي وللجهاز غطاء يقفل باحكام شديد وعلى ذلك فان زيادة بخار الماء داخل الجهاز يؤدي الى رفع درجة الحرارة داخل الجهاز الى ١٢١م ويصل الضغط داخله الى ١٥ باوند

على الانج المربع وان تعريض الاحياء المجهرية لهذه الدرجة من الحرارة والضغط لمدة ١٥–

- ٢٠ دقيقة كاف لقتل اغلب الخلايا الخضرية والسبورات للاحياء المجهرية

صورة رقم (٦) جهاز الاتوكليف (التعقيم بالبخار تحت الضغط)

ج- التعقيم بدرجة الغليان

تؤدي درجة حرارة الغليان الى ابادة كافة الخلايا الخضرية وقسم كبير من سبورات البكتريا وجميع سبورات الاعفان والخمائر وتستخدم هذه الطريقة في تعقيم الاغذية مثل العصائر وغيرها من المواد الغذائية .

جدول (1) درجات الحرارة والضغط والمدة اللازمة للتعقيم

الضغط الجوي	درجة الحرارة	المدة اللازمة للتعقيم
1جو	121م	15-20 دقيقة
1.5 جو	128 م	5 دقيقة
2 جو	134م	عدة ثوان

الاحتياطات الواجب مراعاتها عند تشغيل جهاز الاتوكليف

- وضع كمية كافة من الماء لتوليد البخار المطلوب .
- التاكد من ان البخار يملا الجهاز تماما وحل محل الهواء .
- حساب الزمن اللازم للتعقيم بعد الوصول الى الضغط المطلوب .
- لا يفتح الجهاز الى بعد ان ينخفض الضغط الجوي العادي (صفر) .
- تحتاج المواد الغروية الى فترة اطول في التعقيم من المحاليل الحقيقية وكذلك المحاليل المتعادلة اكثر من الحامضية .

البسترة Pasteurization

اكتشفت هذه الطريقة من قبل العالم الفرنسي باستور ((Pasteurوسميت باسمه ، حيث يمكن من خلالها تدمير الاحياء المجهرية المرضية في بعض المنتجات المهمة مثل الحليب بعض المشروبات الكحولية الا ان هذه الطريقة لا تقتل جميع الانواع الميكروبية حيث يبقى هناك عدد من الانواع غير مرضية للانسان فضلا عن بقاء بعض الفايروسات ان وجدت في الحليب ، مثل فايروسات الفم والقدم وفايروس التهاب الكبد المعدي infection hepatitis virusولهذا فان الحليب المبستر يعد معقما حسب مفهومنا لعملية التعقيم .

هناك طريقتان لاجراء عملية البسترة اولهما تعد طريقة بطيئة ، حيث تستغرق ثلاثين دقيقة يتعرض خلالها السائل لدرجة حرارية قدرها ٦٢,٨ درجة مئوية في اوعية مصممة خصيصا لهذا الغرض ويطلق على هذه الطريقة بـ الطريقة ذات الحرارة الواطئة .

Low Temperature Holding method (LTH)اما الطريقة الثانية فهي سريعة وتستخدم فيها درجات حرارية عالية وفي وقت قصير (HTST) (High Temperature Short Time) حيث يعرض السائل لدرجة حرارة قدرها ٧١,٧ درجة مئوية لمدة ١٥ ثانية فقط في كلتا الطريقتين يجب حفظ السائل بدرجات حرارية واطئة مباشرة بعد عملية البسترة ، وذلك لعدم السماح للاحياء المجهرية التي قاومت عملية البسترة من النمو مجددا .

صورة رقم (٧) جهاز التعقيم بالبسترة

-

التعقيم باستعمال الاشعاعات : Cold Sterilization

يعد الاشعاع ذات الطول الموجي القصير مثل اشعة كاما اكبر تاثيرا من الاشعاعات ذات الطول الموجي الطويل وهناك نوعين من الاشعاعات تستخدم في عمليات التعقيم :

١- الاشعة فوق البنفسجية Ultra Violet light (U.V)

يستخدم لتعقيم غرف العمليات ومختبرات الاحياء المجهرية ومعامل الالبان والادوية . والصفة المميزة لهذا النوع من الاشعاع انها لا تخترق الزجاج لذلك تستخدم لتعقيم الحيز ، كما تمتص الاطوال الموجية لها من قبل الاحماض النووية مما يؤدي الى تلفها .

٢- الاشعة السينية X. Ray

تستخدم لتعقيم الزجاجيات والمواد الاخرى لانها تخترق الزجاج ويؤثر على المادة الوراثية DNA الموجود في الخلية فتعمل على تحللها وتحطيمها والقضاء عليها .

- **التعقيم باستعمال المواد الكيمياوية**

تستعمل المواد الكيمياوية عادة للتعقيم والتطهير ويعتمد تاثيرها القاتل للاحياء المجهرية على عوامل كثيرة منها تجمع البروتين Denaturation of protein، اتلاف الـ Deoxy Ribonucleic acid (DNA) , Deoxy Nucleic acid (RNA)اتلاف الجدار الخلوي او الغشاء السايتوبلازمي او تعطيل بعض الانزيمات البكتيرية .

تستعمل المواد الكيمياوية في تطهير الايدي والمناضد والارضيات وغرف العمليات والفرش والاغطية وغيرها ويتوقف اثر هذه المواد على عدة عوامل :

- تركيز المادة الكيمياوية .
- الوقت الذي تتعرض له الاحياء المجهرية الى هذه المواد .
- كثافة الاحياء المجهرية .
- تركيز ايون الهيدروجين .
- درجة الحرارة وطبيعة الاحياء المجهرية ونوعها .

عند دراسة تاثير المواد الكيمياوية على الميكروبات فاننا يجب ان نتعرف على بعض المصطلحات المهمة :

Disinfection: مبيد مايكروبي يطلق بصورة عامة على المواد الكيمياوية التي تستعمل مع المواد غير الحية الملوثة بالاحياء المجهرية ، حيث انها تكون سامة لو استعملت على الانسجة الحية فكثير من هذه المواد تتمكن من القضاء على الخلايا الخضرية وحتى السبورات عندما تستعمل بتركيز مناسب

Microbiocid : مادة قاتلة للمايكروبات .

Bacteriocid : مادة قاتلة للبكتريا .

Antibiotics : وهي عبارة عن مواد كيمياوية مستخلصة من الاحياء المجهرية لها القدرة على ايقاف نمو او قتل احياء مجهرية اخرى .

Bacteriostatic : مادة توقف نمو البكتريا دون ان تقتلها .

Fungicid : مادة قاتلة للفطريات .

Virucid : مادة قاتلة للفايروسات .

Sporocid : مادة قاتلة لسبورات البكتريا .

Antiseptic : مادة مطهرة وهي توقف نمو بعض الميكروبات وتقتل البعض الاخر .

ومن اهم المواد الكيمياوية المستعملة في التعقيم والتطهير هي :

١. الاحماض والقواعد والاملاح : تتناسب القوة القاتلة للاحماض تناسبا طرديا مع درجة تركيز ايون الهيدروجين (H^{+}) . اما القواعد فيرجع تاثيرها الى ايون الهيدروكسيل (OH^{-}) فكلما كانت القاعدة متاينة اكثر كان تاثيرها اكبر على الاحياء المجهرية . اما الاملاح فاذا كانت محاليلها مخففة فانها تشجع على نمو الاحياء المجهرية بينما التراكيز العالية فانها تكون سامة .

٢. الفينول والكريسول : يستعملان في قتل الاحياء المجهرية ، يعد الفينول مركب كيمياوي ثابت له فعالية كبيرة على الخلايا الخضرية كالبكتريا والفطريات وينعدم تاثيره نسبيا ثابت على بعض انواع البكتريا الممرضة المقاومة والفايروسات . ويتميز الكريسول بان تاثيره مشابه للفينول على الاحياء المجهرية ولكن له قدرة اكبر على الابادة .

٣. الكحولات : تعد الكحولات بانواعها المختلفة مطهرات جيدة بتركيز (٥٠–٨٠%) ولو ان مصادر مختلفة تؤكد على ان الكحول الاثيلي ينحصر عمله الجيد بتركيز ٧٠% فقط . ان التراكيز العالية للكحولات ٩٥% تعمل على انتزاع جزئيات الماء من داخل جسم البكتريا الامر الذي يمنع تشربه الى داخلها . في حين التركيز ٥٠% يكاد يكون تاثيره معدوما على البكتريا . ان الكحول بتركيزه المؤثر ٧٠% يغير من طبيعة البروتين في داخل الخلية كما يعمل مذيبا جيدا للمواد الدهنية .

٤. الالدهايد : يعد مركب الفورمالدهايد من العوامل الفعالة في عملية الابادة وتكن استعماله محدود لما له من تاثير سام ورائحة غير مقبولة يؤثر الفورمالدهايد على البكتريا والعفن والفايروسات ويسمى المحلول العادي للفورمالديهايد بالفورمالين وهو عبارة عن محلول مائي يحتوي على تركيز يتراوح بين (٣٧–٤٠%) فورمالدهايد . ويكون تاثيرها على الاحياء المجهرية عن طريق اتحاده بالمجموعة الامينية الحرة للبروتينات الموجودة في بروتوبلازم الخلايا .

• الهالوجينات: وتشمل اليود والكلور وهي مواد مؤكسدة ويستعمل الكلور في تعقيم مياه الشرب بنسبة (٠,٢-١) جزء بالمليون .

• مركبات المعادن الثقيلة : يعد الزئبق احد هذه المعادن حيث تستعمل مركباته مثل كلوريد الزئبقيك الذي يكون تاثيره قاتل وسام للخلايا ويستعمل بتركيزات ١/١٠٠٠ ، كما تستخدم مركبات الزئبق العضوية مثل الميكروكروم والميرتايونيت . من مركبات المعادن الثقيلة الاخرى نترات الفضة التي تستعمل لقطرات العين .

المنظفات والصابون : تؤثر على بعض انواع البكتريا وهي من المواد المقللة للشد السطحي والذي هو القوة التي تستعمل على تجميع الجزئيات عند سطح السائل من هذه المواد الصابون ، المنظفات الصناعية ، املاح الصفراء ، الاصباغ ، حيث يلاحظ ان المنظفات تقلل من الشد السطحي للسائل وبذلك تساعد على زيادة الابتلال (wetting) وازالة المايكروبات .

جدول (٢) بعض المواد الكيمياوية وتراكيزها الفعالة

المادة	التركيز الفعال	استخداماتها
كريزول	٢%	تعقيم الايدي والمناضد
ليسول	٢%	تعقيم الايدي والمناضد
ديتول	٢٥%	تعقيم الايدي والمناضد
الكحول	٧٥%	يقتل الخلايا الخضرية ولا يقتل السبورات للبكتريا
الفورمالديهايد	٥%	قتل كل الخلايا الخضرية
محلول كلوريد الزئبقيك	٠,٦%	يستعمل لتعقيم البذور
الفينول	٠,٥%	يقتل معظم الاحياء المجهرية

صور رقم (٨) مجموعة من المواد الكيمياوية والمطهرات المستخدمة في التعقيم

- التعقيم بالوسائل الميكانيكية

وتقسم الى قسمين :

١. عملية تحطيم الخلايا البكتيرية
٢. عملية ازالة الخلايا البكتيرية

اولا : علمية تحطيم الخلايا البكتيرية

وتشمل عمليات السحق (Crushing) باستعمال الموجات فوق الصوتية (Ultrasonic vibration) والتي يمكن احداثها في السوائل بواسطة التيار الكهربائي لاقراص النيكل المهتزة ويكون تاثيرها على الخلايا قاتلا اذ يعمل على تمزيق الغشاء الخلوي للخلايا البكتيرية وبالتالي انتشار السايتوبلازم .

ثانيا : عملية ازالة الاحياء البكتيرية وتشمل :

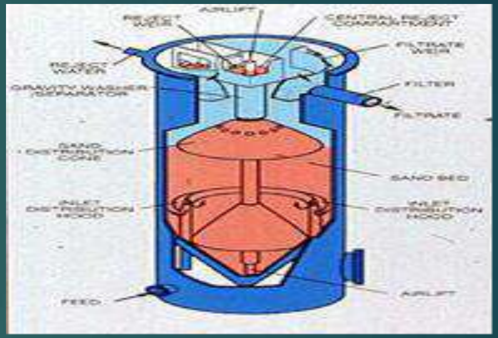
أ- الترشيح : **Filtration**

بعض المواد السائلة تتلف عند تعرضها للحرارة لغرض تعقيهما مثل الفيتامينات ، اليوريا ، الاحماض الامينية ، السموم البكترية ، الانزيمات ، المصول ، المحاليل المحتوية على بيكاربونات الصوديوم ، لذلك تعقم هذه السوائل باستخدام المرشحات البكتيرية التي تصنع من مواد مختلفة ويعتمد استخدام المرشحات على ان مساحاتها تتراوح اقطارها ٠,١-٠,٢ مايكرون لا تسمح بمرور الخلايا البكتيرية ولوان الفايروس يمر خلالها .

١. مرشح زايتوس Seitz filter يتركب من قمع من المعدن الصلب غير القابل للصدا ويوضع به اقراص من الاسبستوس ثقوبها تمنع البكتريا من المرور او قد يصنع الاقراص من السليلوز او الاسيتيل سيليلوز .
٢. مرشح Chamberland filter: مصنوع من الخزف غير المصقول .
٣. مرشح Berkfeld filter : مصنوع من تربة مكونة من اغلفة الدايتومات .
٤. مرشح Sintered-Glass filter : مصنوع من الياف زجاجية متشابكة .

الاحتياطات التي تراعى عند التعقيم بالمرشحات :

١. يجب تعقيم جهاز الترشيح بجميع ملحقاته بعد لفه بورق كرافت سميك .
٢. يجب عند التعقيم بهذه الطريقة استخدام التفريغ او الضغط للاسراع من عملية الترشيح.
٣. يجب اختبار دقة عملية الترشيح Sterility test وذلك بتلقيح جزء من الراشح في بيئة قياسية وتحضينها بدرجة حرارة مناسبة وعدم ظهور نمو دليل على دقة عملية التعقيم .
٤. بعد انتهاء عملية الترشيح تنظف المرشحات جيدا ويتوقف ذلك على نوع المرشح .



صورة رقم (٩) المرشحات المستخدمة في التعقيم

ب- استخدام قوة الطرد المركزي المتمثلة بجهاز Centrifuge وبسرعة عالية حيث تعمل على ترسيب الخلايا المجهرية .

صورة رقم (١٠) جهاز الطرد المركزي

اطباق بتري

انبوب اختبار

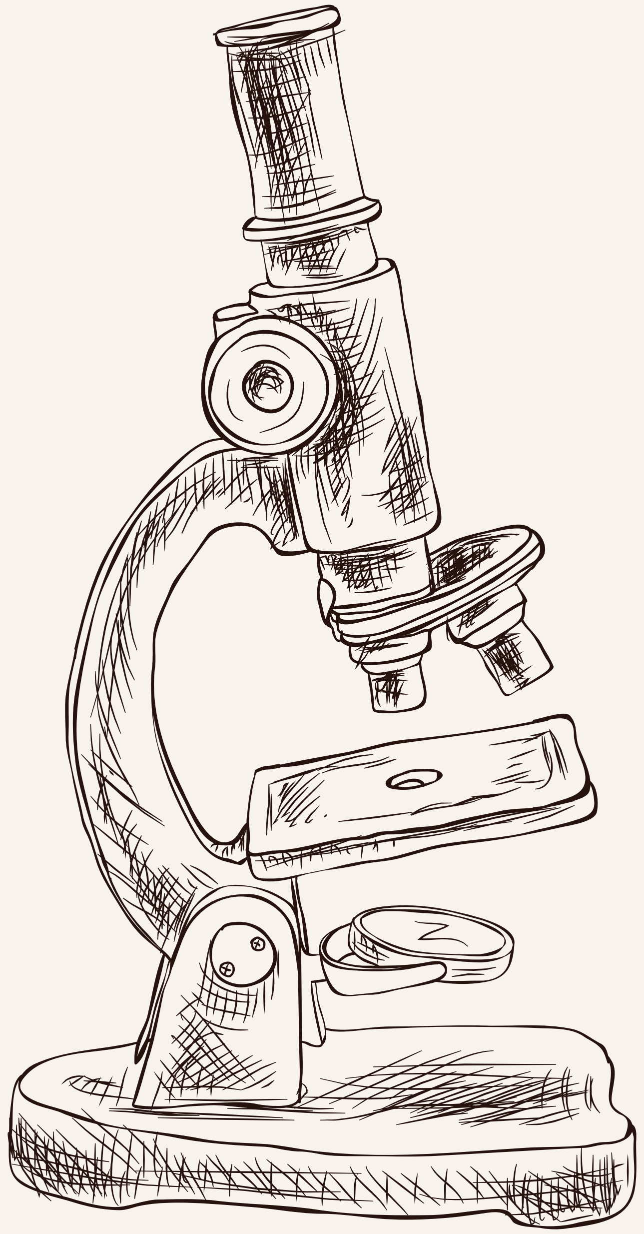
مصباح بنزن

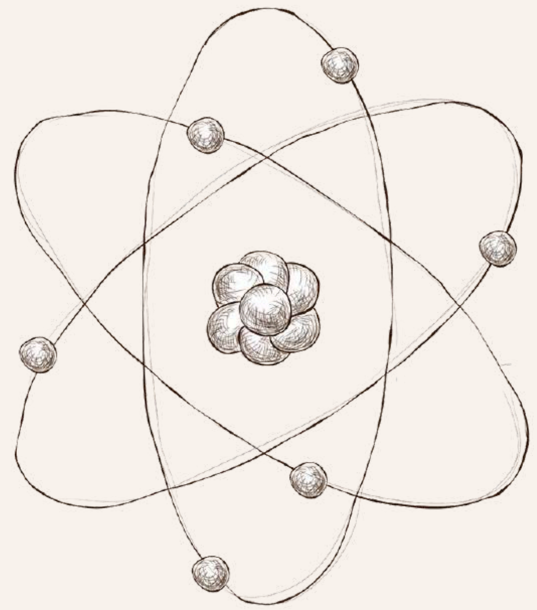
ابرة تلقيح ذات العقدة

ملقط

صور رقم (١١) بعض الادوات والزجاجيات المستخدمة في مختبر الاحياء المجهرية

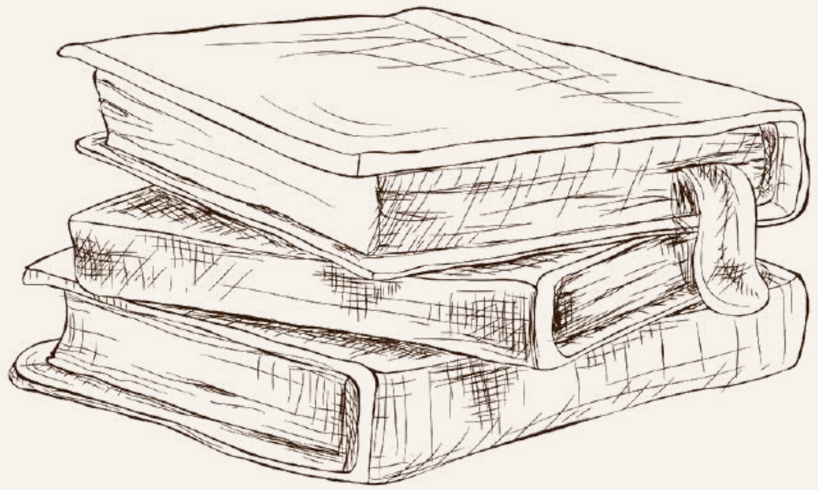
الاوساط الغذائية
CULTURE MEDIA





اعداد:

د.رنا خالد احمد



الوسط الغذائي :

هو خليط من مواد ضرورية لنمو و تكاثر الكائن المجهري يقوم بتجهيز ما يحتاجه الكائن من مواد غذائية ضرورية كما يستخدم الوسط الغذائي في التعرف على اشكال المستعمرات البكتيرية لعزلها و تشخيصها مختبريا ولابد من توفر العناصر الضرورية في اي وسط غذائي مثل

: و بعض العناصر المعدنية مثل

اضافة للماء و احياناً عند الضرورة بعض الفيتامينات و يجب ان تكون درجة تركيز الهيدروجين ملائمة لنمو الميكروبات و تختلف الميكروبات في احتياجها للمواد الغذائية اذ لا يوجد وسط واحد مناسب لكل المايكروبات و بناءًا على ذلك تقسم الاوساط الى قسمين

الاوساط الغذائية الطبيعية :

يمكن استغلال بعض المواد الطبيعية كوسط غذائي لنمو الكائنات المجهرية مثل مصل الدم و المخلوط مع الكبد لتنمية بعض انواع البكتيريا الممرضة و يعد الحليب من الاوساط الطبيعية بعد ازالة المادة الدهنية كما تستخدم اوساط من مستخلص البطاطا و الجزر في زراعة الكثير من الاحياء المجهرية و من المصادر الطبيعية الاخرى نقيع اللحم و خلاصة اللحم كما يستخدم البيض المتخثر كويط زرعي لبكتيريا الخناق اما خلاصة الخميرة و البتون فمها عبارة عن بروتين من مصدر طبيعي و الـ هو العامود الفقري للاوساط الغذائية استخدم لاول مرة من قبل العالم عام لتنمية البكتيريا و منذ ذلك الحين اصبح من العناصر الاساسية المهمة و هو عبارة عن مركبات ناتجة عن تحلل البروتينات بالانزيمات

الاوساط الغذائية الصناعية :

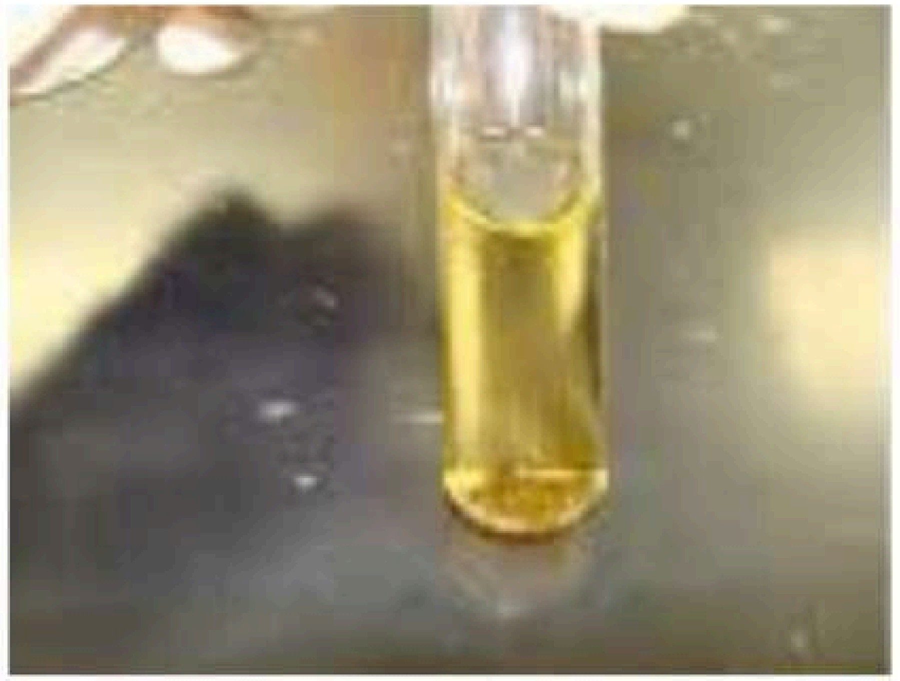
تتركب الاوساط الغذائية الصناعية من مواد عضوية و غير عضوية معقدة و مختلفة و مكوناتها غير معروفة بشكل مضبوط و دقيق كما و نوعا و تستخدم لتنمية انواع معينة من الاحياء المجهرية

و يمكن تقسيم الاوساط الغذائية الصناعة حسب القوام الى

١ اوساط سائلة او

٢ اوساط شبه صلبة يكون هذا الوسط يحتوي على مواد صلبة بكميات قليلة حوالي

٣ اوساط صلبة و هي اوساط تحتوي على مادة الاكار غم لتر



صورة رقم (12) الوسط الغذائي السائل

صورة رقم (13) الوسط الغذائي الصلب

الجيلاتين Gelatin :

هو مادة بروتينية ذات قيمة غذائية ناقصة تستخدم لتصلب الاوساط الغذائية و تضاف بنسبة الى الوسط الغذائي من مساوءه انه يذوب بدرجة حرارة الحاضنة م كما انه عرضة للتحلل من اغلب الاحياء المجهرية و ذلك يفقد خاصية التصليب و لهذين السببين حدد استخدامه لاغراض معينة فقط و يستعمل في زرع الفايروسات و بعض الخلايا الحية كالخلايا السرطانية

اكار Agar :

مادة كربوهيدراتية معقدة يستخرج من يعض الاعشاب البحرية ليس له قيمة غذائية كما لا تستطيع الاحياء المجهرية تحلله اي لا يستخدم مادة غذائية من قبل الاحياء المجهرية يضاف بنسبة يتصلب بدرجة حرارة م و يبقى سائلا بدرجة حرارة و من خصائصه انه يذوب بدرجة حرارة م

تصنيف الاوساط الغذائية حسب الاستخدام :

١-اوساط غذائية بسيطة Simple media :

و هي تلك الاوساط الغذائية الحاوية على املاح معدنية و ماء تنمو عليه البكتيريا التي لا تحتاج الى مواد غذائية غنية

٢-اوساط غذائية اعتيادية Ordinary media :

و هي تلك الاوساط الغذائية الحاوية على مواد غذائية بسيطة و اولية تساعد البكتيريا على النمو و التكاثر مثل

٣-الاوساط الغذائية الغنية Enriched media :

و هي تلك الاوساط الغذائية الغنية بمحتواها الغذائي مثل اوساط اكار الدم
حيث تسخدم هذه الاوساط لتنمية مكورات السيلان و
المكورات الرئوية
، p، ،

حيث تدعم هذه الاوساط بمواد تساعد على نمو الاحياء كالمصل و الدم و
السائل الخلبي
حيث تضاف نسبة او كلوكوز تضاف هذه
المواد بعد تعقيم الوسط لان درجة الحرارة العالية تعمل على اتلاف البروتين
الموجود فيه و بالتعالي تعطيه الامثلة عليه

١-اكار الدم Blood agar :

عبارة عن وسط الاكار المغذي
يضاف اليه الدم
بعد تعقيمه و تبريده الى درجة حرارة
م بنسبة ثم يخلط
جيدًا و يصب في اطباق بتري

٢-وسط الجوكليت الصلب Chocolate agar :

هو وسط غني و هو عبارة عن وسط اكار الدم الذي يسخن بوضعه في الماء المغلي دقائق خيث يتحول اللون الى اللون البني لون الشكولاته ثم يصب في اطباق بتري يستخدم لعزل البكتيريا المحبة للدم

حيث يتحول الهيموكلوبين بالتسخين الى الهيماتين و ذلك بتكسير كريات الدم الحمراء و خروج محتوياتها

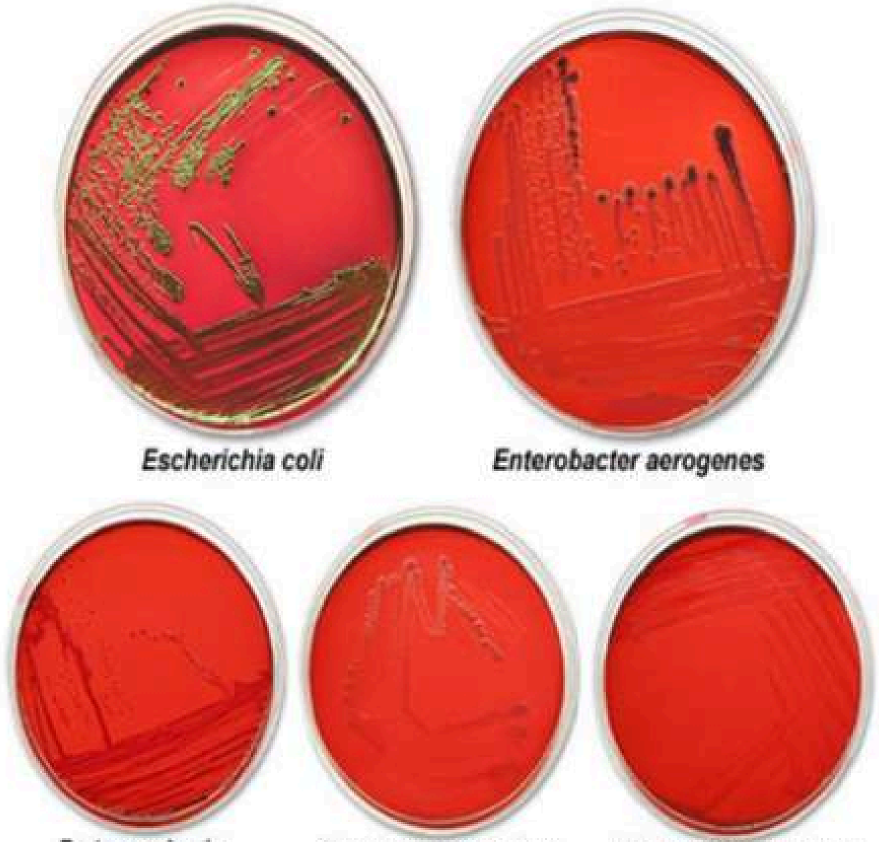
٤-الاوساط الانتخابية Selective media :

هي تلك الاوساط الغذائية التي تسمح بنمو واحد او اكثر من الاحياء المجهرية وتمنع نمو الانواع الاخرى ان اضافة صبغة الكرستال البنفسجي h او المثيل الازرق او الكاربول فوكسين h يؤدي الى نمو انواع معينة من البكتريا على سبيل المثال وسط الماكونكي ووسط s يسمح بنمو البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام ويمنع نمو البكتريا العصوية والكروية الموجبة لصبغة كرام وسط يسمح بنمو بكتريا وبكتريا بينما وسط يسمح بنمو بكتريا الخناق h و يمنع نمو الانواع الاخرى

Macconkey- Agar

Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis Micrococcus luteus

MSA (Mannitol Salt Agar)



Escherichia coli Enterobacter aerogenes

Proteus vulgaris Salmonella typhimurium Staphylococcus aureus

EMB (Eosin Methylene Blue) Agar

٥-الاوساط الغذائية التفريقية Differential media :

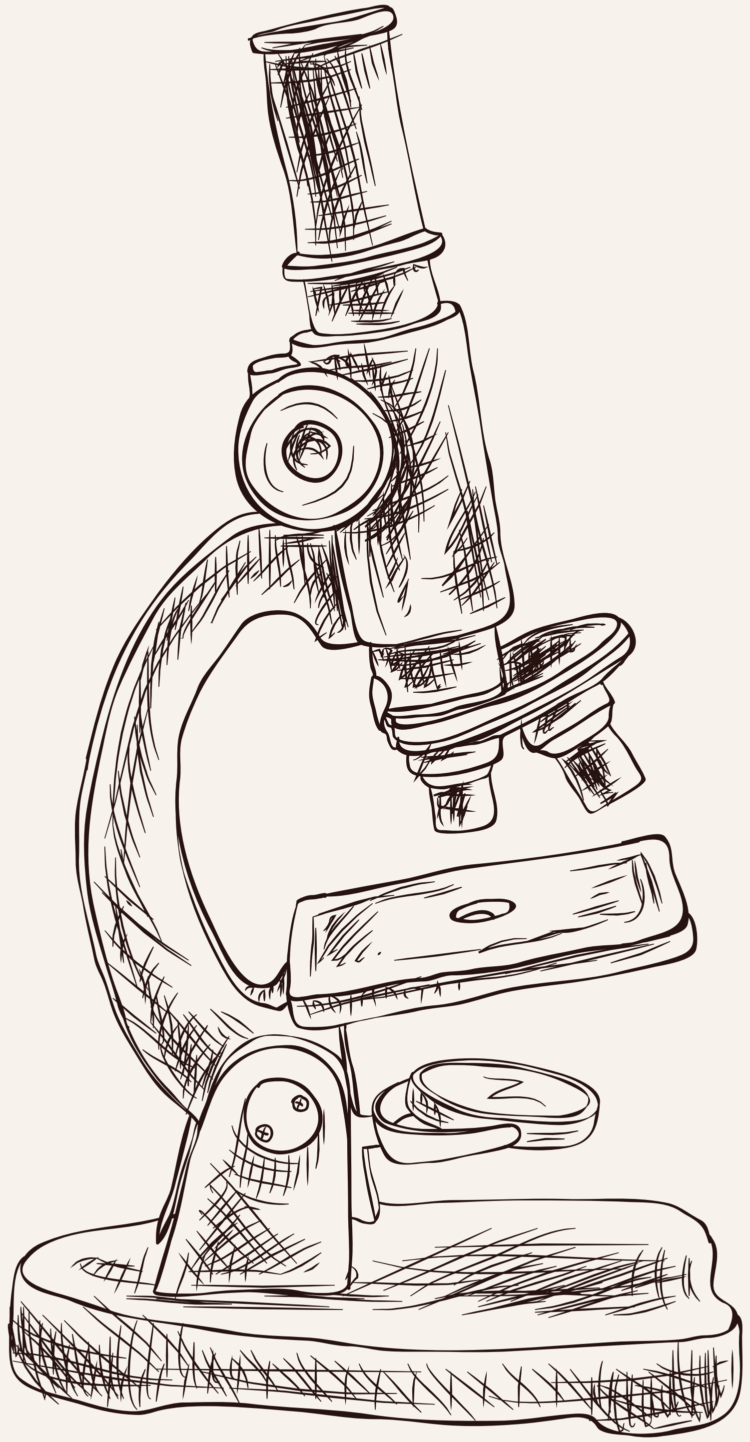
و هي اوساط ينمو عليها نوعين فقط من الكائنات المجهرية او اكثر كما يمكن تفرقة هذه الانواع على هذه الاوساط مثل وسط اكار الدم الذي يستخدم للتفرقة بين البكتيريا المحللة للدم عن البكتيريا التي لا تحلله يعد نمو هذه البكتيريا على هذا الوسط من التفريقية الاخرى وسط سيمون سترات وسط اكار اليوريا

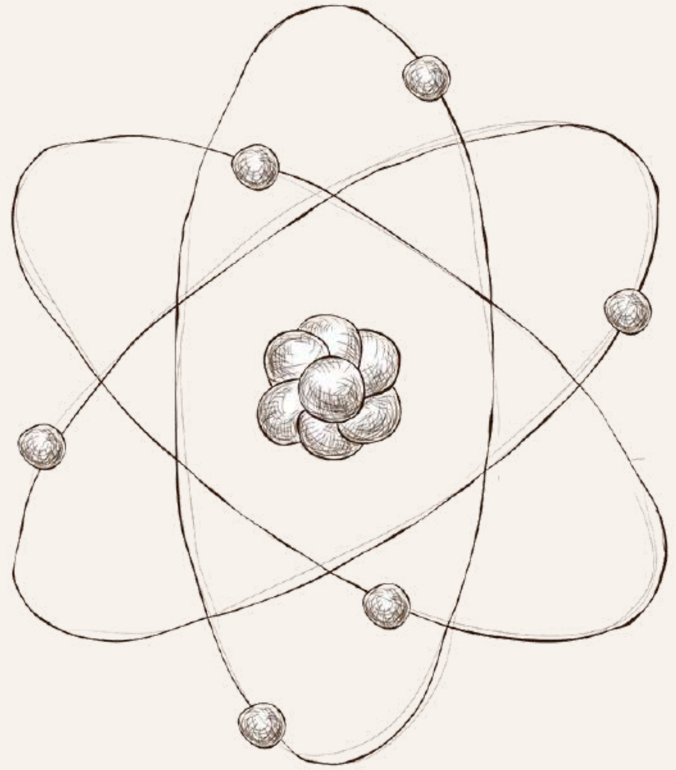
Blood Agar

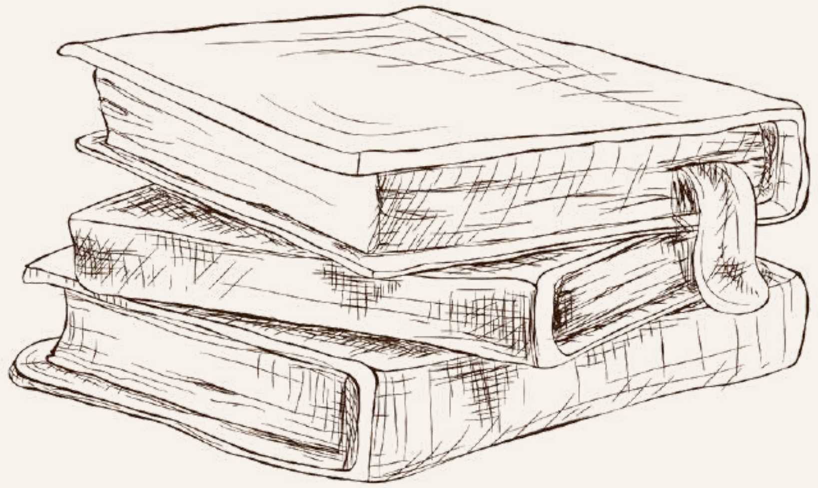
Urea Agar

Simons's Citrate Agar

Thank you!







صبغ البكتريا Bacterial staining

البكتريا كائنات حية دقيقة عديمة اللون شفافة ، ولذلك فانه من الصعب رؤيتها في التحضيرات غير المصبوغة ، من اجل ذلك فان صبغ البكتريا يعد من العمليات الضرورية لتمييز البكتريا عن الوسط الذي تتواجد فيه وكذلك لتسهيل دراسة الشكل الظاهري والتركيب الداخلي والخارجي للبكتريا مما يساعد على التعرف عليها وتصنيفها .

الصبغات Dyes

الصبغة عبارة عن مادة كيمياوية عضوية ملونة لها القدرة على التفاعل مع بعض المواد الاخرى وتكسبها لونا معينا . واغلب الصبغات المستعملة في الدراسات البكتريولوجية تنتمي الى مجموعة الالنين Aniline تذوب في الماء او الكحول وتقسم الى :

1- صبغات حامضية : يرجع لونها الى الايونات السالبة وهذه تتفاعل مع المواد القاعدية الموجودة في الخلية ومن الامثلة عليها صبغة الفوكسين الحامضي Sodiumeosinate الذائب في الماء أي ان الصبغة تحمل شحنة سالبة ، كذلك صبغة النيجروسين Nigrosin واحمر الكونغو Congored stain.

2- صبغات قاعدية : ويرجع لونها الى الكاتيونات الموجبة وهذه تتفاعل مع المواد الحامضية في الخلية ومن هذه الاصباغ الفوكسين القاعدي ، السفرانين ، الكريستال البنفسجي ، ازرق المثيلين ، اخضر الملاكايت ، ولهذه الاصباغ قدرة كبيرة على صبغ الخلية البكتيرية ويمكن صبغ الاجزاء الداخلية والخارجية مثل الكبسول Capsule، الاسواط Flagella ، والسبورات Spores .

يمكن فحص شكل الخلية البكتيرية بطريقتين :

- فحص البكتريا الحية غير المصبوغة كما هو الحال في فحص حركة البكتريا باستخدام تقنية القطرة المعلقة Hanging drop .
- فحص البكتريا الميتة المصبوغة Staining of bacteria .
- تكون البكتريا الحية عديمة اللون ولا يمكن رؤيتها بصورة واضحة ولهذا عندما تصبغ بصبغات معينة يصبح مخالفا للون المحيط وللصبغة اهمية كبيرة في دراسة الاحياء المجهرية وذلك للاسباب التالية :
- يمكن دراسة المظهر الخارجي للبكتريا الذي يشمل شكلها وتجمعها وترتيبها .
- دراسة بعض التراكيب الداخلية مثل السبورات .
- يتم الفحص باستخدام العدسة الزيتية .

وهناك العديد من الصبغات المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية (مختبرات الكتريولوجي) وتقسم حسب الغرض من استخدامها الى :

أ- الصبغات البسيطة Simple stain.

ب-الصبغات التفاضلية Differential stain وهذه تشمل :

1. صبغة كرام Gram stain .

2. لصبغة المقاومة للاحماض Acid Fast Stain .

ج-الصبغات التركيبية Structural stain وهذه تشمل :

3. صبغة السبورات الداخلية Endospore stain .

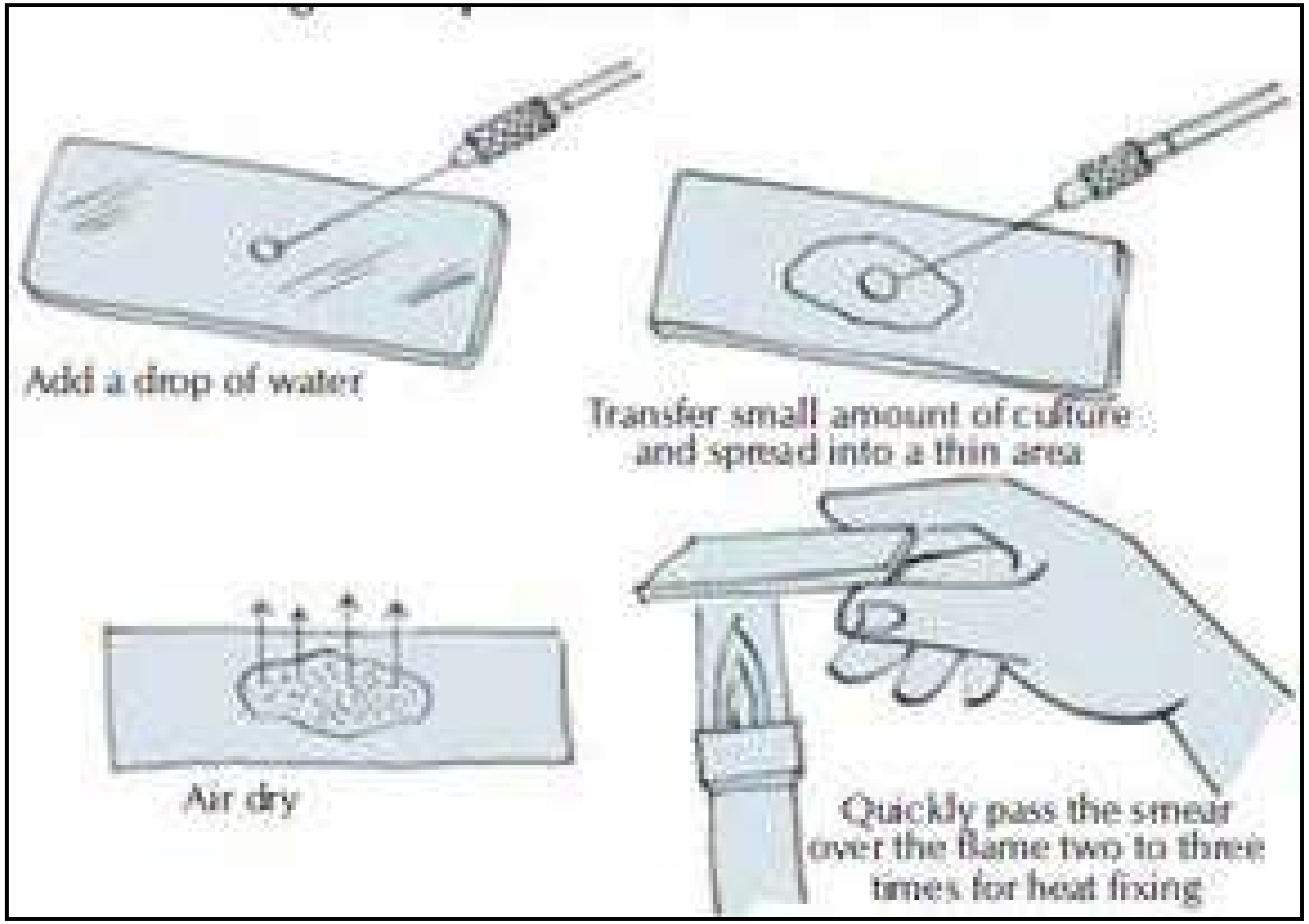
4. صبغة المحفظة Capsule stain .

5. صبغة الاسواط Flagella Stain .

كيفية تحضير الشريحة للصبغ

- تتم العملية كما يلي :
- يغسل السلايد بالماء المقطر ويجفف .
- يوضع السلايد على المنضدة ثم تؤخذ حملة لوب من المزرعة السائلة وتفرش على الشريحة الزجاجية وتجفف وتمرر على اللهب ثلاث مرات لغرض التثبيت اما اذا كانت المزرعة صلبة slant agar فيتم اضافة قطرة من محلول ملحي فسلجي او ماء مقطر على وبعد تحريك اللوب داخل السلانت تحصل على معلق بكتيري فناخذ حملة لوب ونفرش على الشريحة وتجفف وتعامل باللهب (3) مرات .

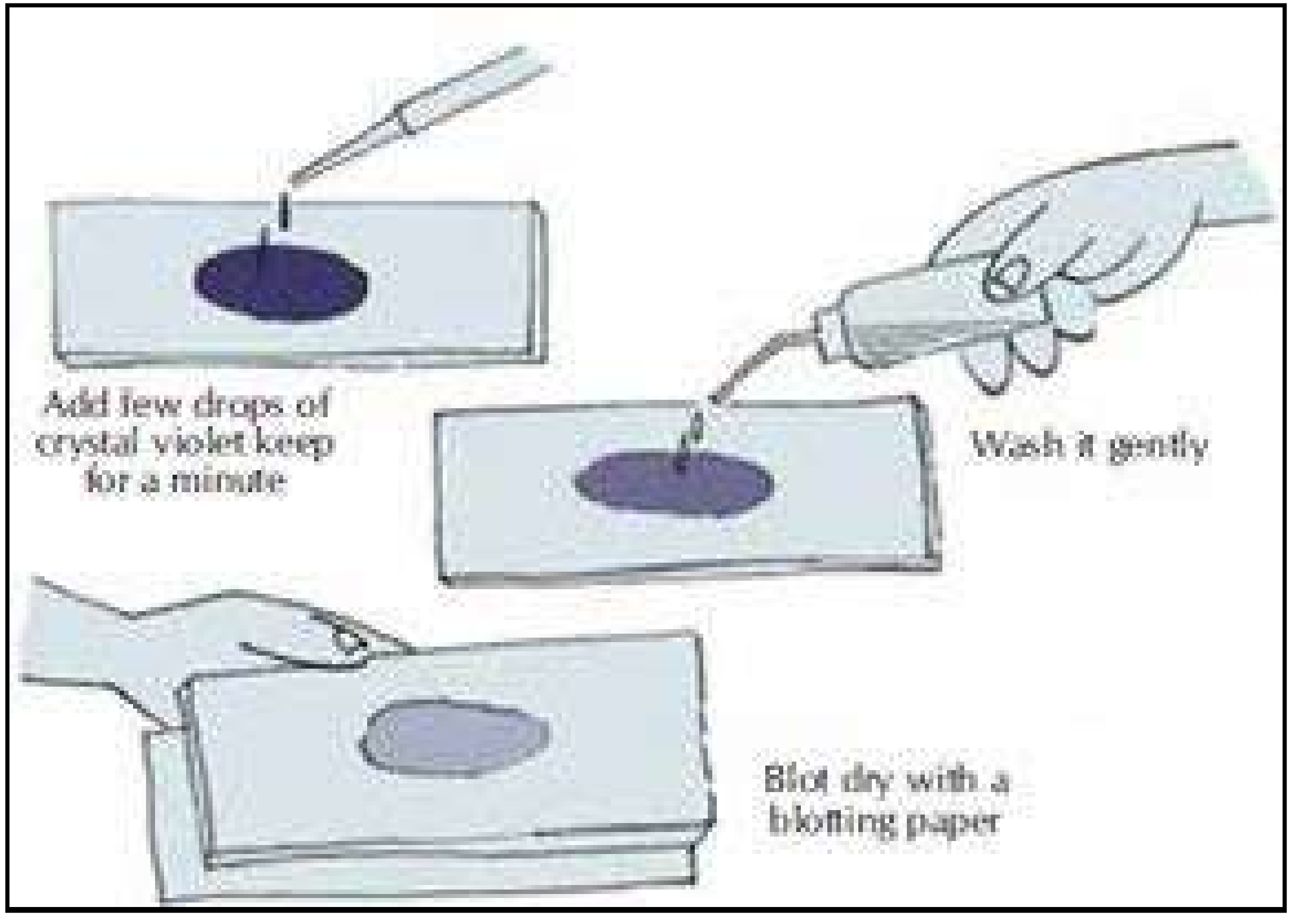
صورة رقم (37) كيفية تحضير مسحة البكتريا



طرق الصبغ Staining methods

- 1- الصبغة البسيطة simple stain
- يقصد بها استخدام نوع واحد من الصبغات اما المثيل الازرق او أي من الصبغات القاعدية والحامضية .
- **طريقة العمل :**
- 1- حضر شريحة زجاجية كما مذكور سابقا وصولا الى مرحلة التثبيت باللهب .
- 2- ضع الشريحة على حامل زجاجي واسكب عليه الصبغة وتترك (2-3) دقيقة ثم تغسل بالماء المجاري ويجفف ثم نفحص .

صورة رقم (38) كيفية صبغ البكتريا باستخدام الصبغة البسيطة



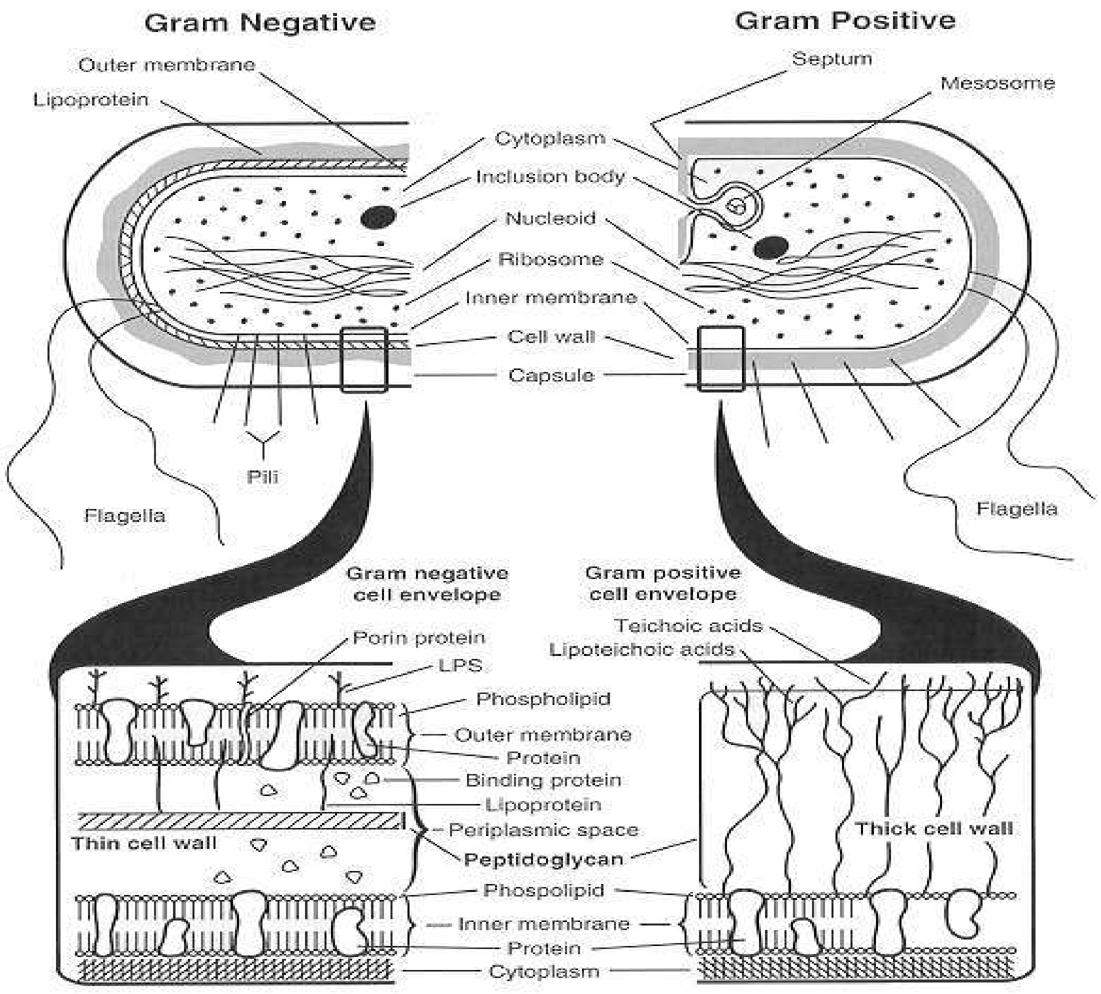
الصبغة التفريقية (التفاضيلية) Differential Stain

- **صبغة كرام Gram stain**

- قسمت البكتريا الى مجاميع اعتمادا على قابليتها في اخذ واستبقاء اصباغ معينة وان اجراء التصبيغ المستعمل كثيرا والقادر فعلا على تقسيم البكتريا الى مجموعتين هو صبغة كرام Gram stain اكتشفت من قبل العالم Hans Christian Gram وهو طبيب دانماركي حيث استخدمها في تشخيص البكتريا الرئوية وتتضمن استخدام صبغة البنفسج البلوري Crystal Violet حيث تصبغ البكتريا جميعها ثم يضاف بعد ذلك اليود المخفف يعمل على تقليل قابلية ذوبان البنفسج البلوري داخل الخلية وذلك بارتباطه مع الصبغة لتكوين معقد الصبغة واليود لارتباط الصبغة مع املاح المغنيسيوم للحامض النووي RNA الموجود في جدار الخلية الموجبة والغير الموجود في الخلية السالبة لصبغة كرام . تعامل بعد ذلك بمذيب عضوي مثل الايثانول الذي يزيل الصبغة واليود من البكتريا السالبة لصبغة كرام فقط واخيرا تستعمل صبغة حمراء مثل safranin السفرانين حيث تصبغ بها البكتريا السالبة وتظهر حمراء اللون بينما تحافظ البكتريا الموجبة لصبغة كرام على معظم الصبغة لتظهر بلون بنفسجي تحت المجهر .

-

صورة رقم (39) الفرق في الجدار الخلوي بين البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام



* هناك بعض الامور التي تؤدي الى حدوث خلل في عملية التصبيغ :

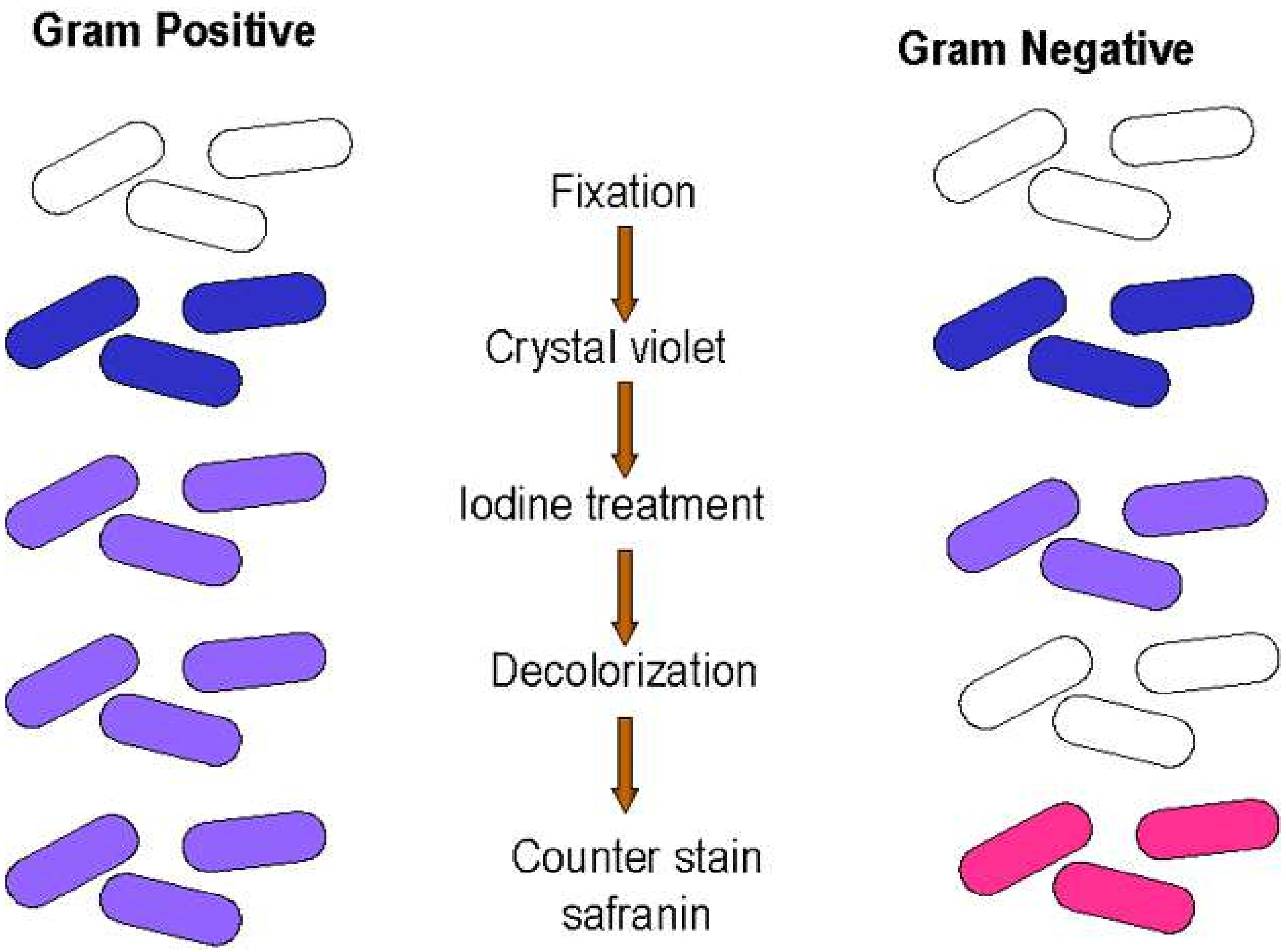
- وجود انزيمات حالة لجدار البكتريا فهذه تعمل على افشال التصبيغ .
- استخدام مزارع قديمة تحتوي على خلايا بكتيرية ميتة ومتحللة .
- استخدام خلايا بكتيرية ذات جدار خلوي مهشم بفعل انزيمات اللايزوزايم او بفعل ميكانيكي او فيزياوي .
- حالة تغير pH الوسط الى الحامضي .

- في حالة اذابة لـ RNA بانزيم Ribonuclease

طريقة العمل

1. يتم تحضير مسحة البكتريا وتثبيتها بالنار الهب مصباح بنزن .
2. تضاف الصبغة الاولى Crystal violet البنفسجية تترك على الشريحة لمدة 2–3 دقائق ثم تغسل الشريحة بالماء الجاري .
3. تسكب الصبغة الزائدة ويضاف الايودين Gram Iodin ويترك لمدة دقيقة واحدة .
4. تعامل المسحة بالكحول الاثيلي حيث يضاف قطرة قطرة ثم يغسل بالماء الجاري .
5. تضاف الصبغة المخالفة Counter stain السفرانين الحمراء لمدة دقيقة واحدة – دقيقتين
6. تغسل بالماء الجاري وتجفف وتفحص .

صورة رقم (40) تفاعل الخلايا البكتيرية مع صبغة كرام



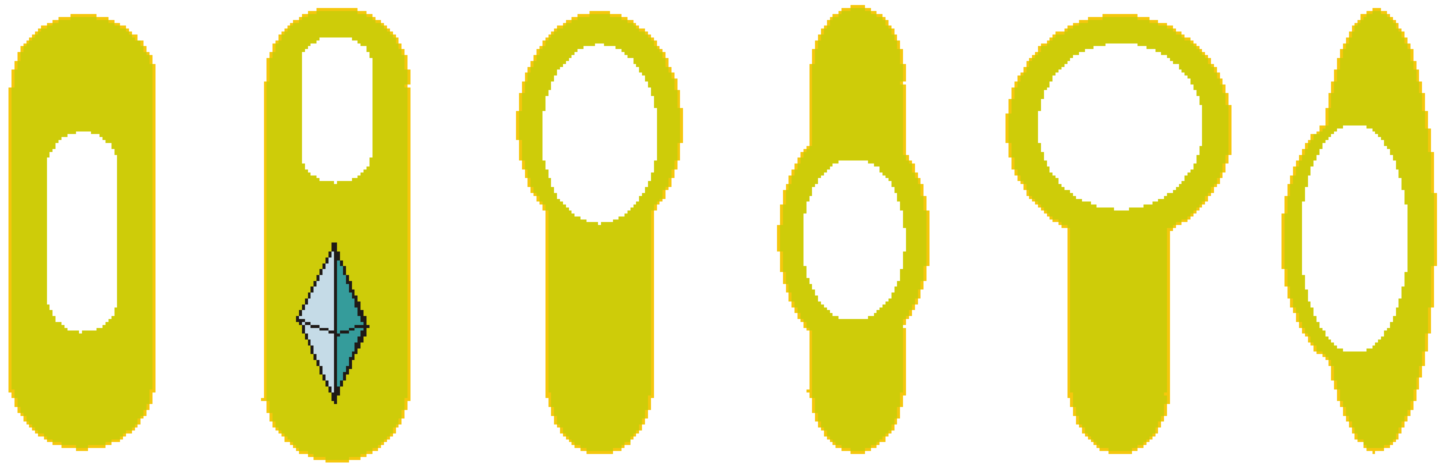
صبغ السبورات Spore Staining

ان لبعض الانواع البكتيرية القدرة على انتاج الابواغ (السبورات Spores) والتي بدورها تكون مقاومة للعوامل والظروف الخارجية المحيطة بها حيث يمكن بقاؤها فترات طويلة تحت الظروف غير الطبيعية مثل درجات الحرارة العالية والمواد الكيمياوية السامة وتتصف معظم اجناس الـ Bacillus والـ Clostridium بقابليتها على انتاج السبورات وعادة لا تصبغ السبورات بالصبغات الاعتيادية ولهذا السبب يجب استعمال صبغات معينة مع التسخين في بعض الاحيان لتثبيت هذه الصبغات .

مواقع السبورات في الخلية البكتيرية :

- 1- السبور الوسطي (المركزي) Central spore
- كما في بكتريا *Bacillus subtilis* .
- 2- السبور الوسطي (المنتفخ) : Central Swollen spore
- كما في بكتريا *Clostridium multifermentans* .
- 3-السبور في نهاية الخلية (غير منتفخ) Terminal spore.
- كما في بكتريا _*Clostridium fallax*
- 4- السبور في نهاية الخلية و(منتفخ) Terminal swollen spore
- كما في _*Clostridium tetani*
- 5- السبور الذي يشغل معظم الخلية subterminal belongated spore
- كما في بكتريا *Clostridium sporgenes* .

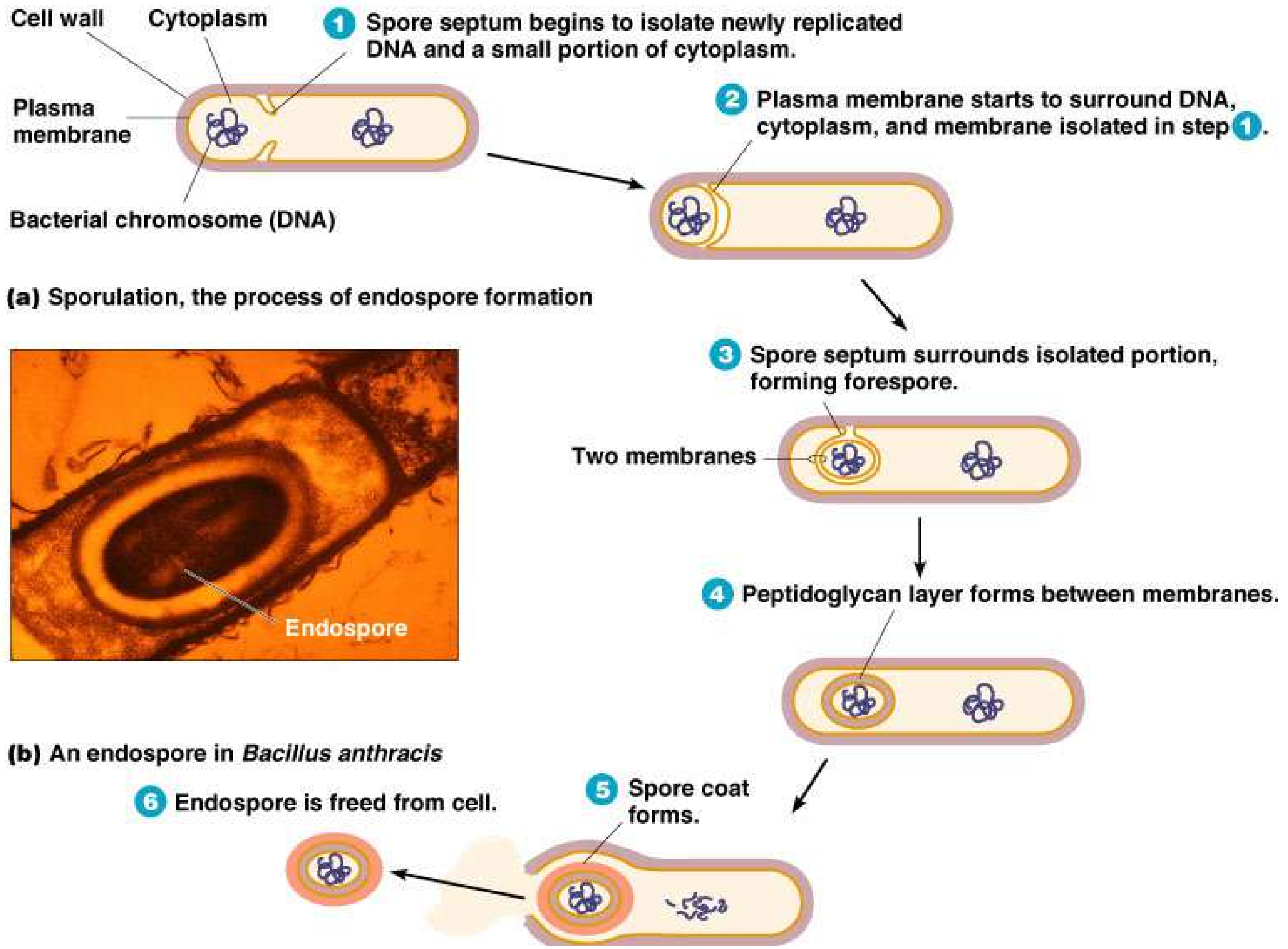
صورة رقم (42) مواقع السبور داخل الخلية البكتيرية



تكوين السبور (الابواغ) Spore formation

تبدأ بعض الانواع البكتيرية وخاصة العصوية الموجبة لصبغة كرام كجنس *Bacillus sp* وجنس *Clostridium sp* بتكوين تراكيب مقاومة داخل الخلية تعرف بالابواغ (Endo Spores) لها القدرة على مقاومة الظروف البيئية غير الملائمة كالحرارة العالية والجفاف وقلة الغذاء . وتعزى مقاومة الابواغ الى عدم نضوج الغشاء البوغي Spore membrane والى محتواه القليل من الماء وفعاليته الايضية الواطئة ومحتواه العالي من الكالسيوم . يتكون البوغ داخل الخلية الناضجة (في نهاية فترة نموها النشيط) . يبدا بتضاعف كروموسوم الخلية ويصبح السايتوبلازم حبيبي بعد ان كان متجانس في التركيب اثناء فترة النمو والتكاثر ويتكاثف السايتوبلازم في موضع معين من الخلية الخضرية حول الكروموسوم ثم تتجه محتويات الخلية الاساسية في هذا الموضع ويحاط بغشاء ثم تتكون طبقات سميكة من الاغلفة تحيط بغشاء الخلية للمحافظة على المحتويات في الداخل ، واخيرا يتمزق جدار الخلية الخضرية المكونة للبوغ وتتحلل ثم ينطلق البوغ ، ويبقى طليقا بحالة سبات الى ان تتوفر الظروف الملائمة له شاشة فيعود للانبات الى خلية خضرية جديدة لها صفات البكتريا الاصلية نفسها المتكون منها لذلك لا يعد تكوين الابواغ وسيلة تكاثرية فكل خلية خضرية واحدة تكون بوغا واحدا وعند الانبات ينتج البوغ الواحد خلية خضرية واحدة . ان وجود dipicolin acid في الابواغ له علاقة في مقاومة الظروف الخارجية القاسية .

صورة رقم (43) عملية تكوين السبور في البكتريا



جدول (3) اهم الفروقات بين الشكل البوغي والشكل الخضري للخلية البكتيرية

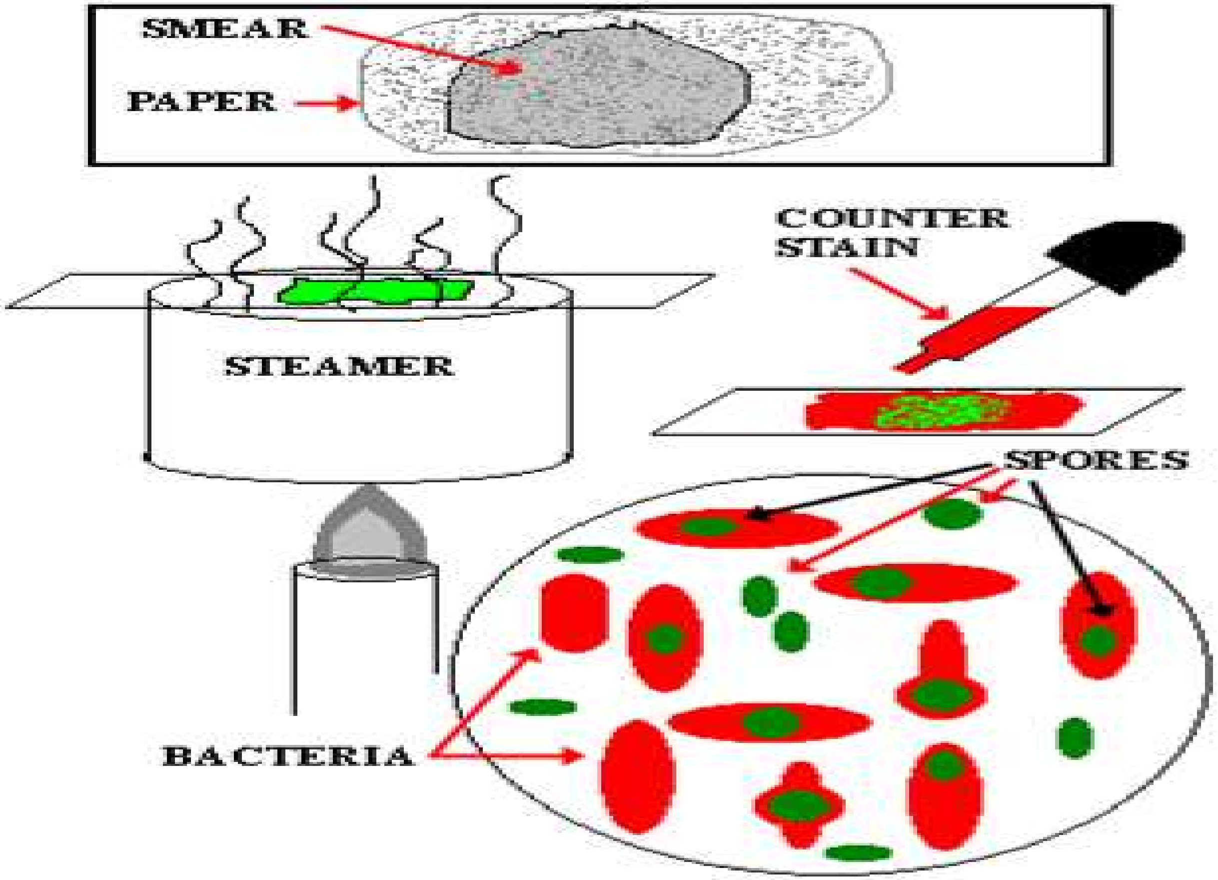
البوغ	الخلية الخضرية	
موجود	غير موجود	**Dipicolin acid**
10%	1%	**الكالسيوم Ca**
مقاوم	غير مقاوم	**التسخين بدرجة حرارة 90م**
90%	10%	**مقدار البروتين في السايتوبلازم**
قليل جدا	75-85%	**مقدار الماء**
في دور السبات (cryptoboisis)	**نشطة**	**Metabolism**

المواد اللازمة

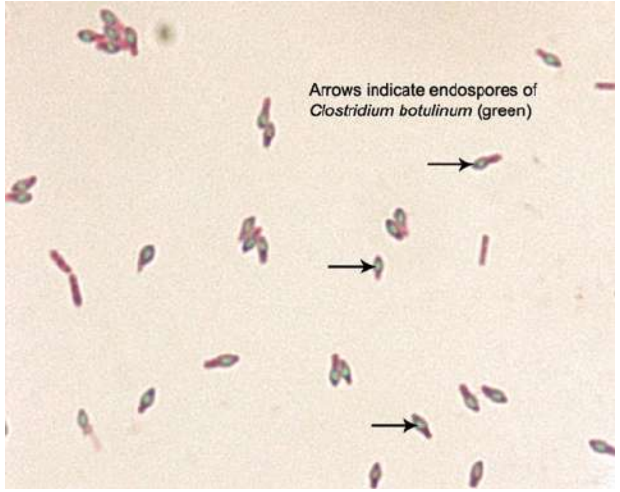
- 1- مزرعة لبكتريا *Bacillius subtilis* او *clostridium sporgenes* عمرها 72 ساعة او مزرعة بكتيرية.
- 2- محلول Malachite 5% .
- 3- محلول Safranin 0.5% .
- 4- شرائح زجاجية نظيفة .
-
- طريقة شيفر وفولتون Schaeffer and fulton .
  - تحضر مسحة من بكتريا *B. Subtilis* وتجفف بالهواء وتثبت باللهب .
  - يوضع محلول Malachite green على المسحة ثم تسخن الشريحة الى ان يبدا المحلول بالتبخر مع عدم غليان الصبغة تستمر العملية لمدة 5 دقائق مع ملاحظة عدم جفاف الصبغة في حالة جفافها يجب اضافة المزيد من الصبغة .
  - تغسل الشريحة بالماء الجاري بهدوء .
  - تضاف صبغة السفراتين المخالفة باللون وتترك لمدة دقيقة واحدة .
  - تغسل الشريحة بالماء وتجفف بورق النشاف .
  - تفحص تحت العدسة الزيتية وترسم حيث تصبغ اجزاء الخلية باللون الاحمر الوردي اما السبورات فتصبغ باللون الاخضر .
-

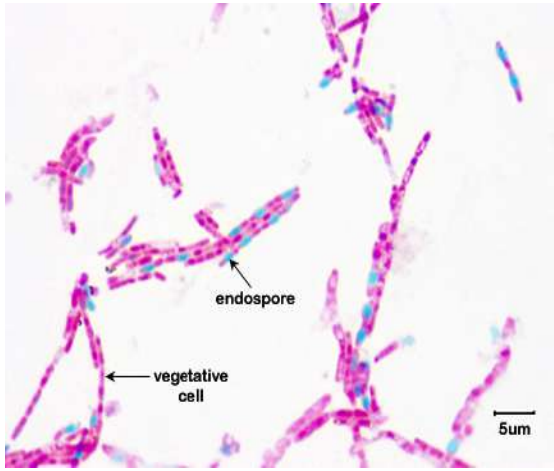
.

صورة رقم (44) طريقة شيفر وفولتون لصبغ السبورات



صورة رقم (45) السبورات المصبوغة باللون الاخضر





صبغ الكابسول (المحفظة) Capsule Staining

الكابسول عبارة عن غلاف يتكون من مواد لزجة جيلاتينية تحيط بالخلية البكترية بشكل طبقة متميزة وتكون اكثر سمكا من قطر الخلية التي تحيط بها ، وتختلف الطبيعة الكيمياوية للكابسول من بكتريا الى اخرى وهي على الاغلب تتكون من متعدد السكريات polysaccharides كما في بكتريا المكورات الرئوية *Diplococcus pneumoniae* او تتالف من مادة متعدد الحامض الاميني كلوتاميك D- glutamic acid polpeptide كما في عصيات الجمرة الخبيثة *Bacillus anthacis* وتفرز الكبسول من بعض البكتريا المرضية وفي ظروف خاصة ولا يتكون الكابسول الا داخل الجسم .

فوائد الكابسول

1. تحمي الخلايا البكتيرية من أي هجوم تقوم به كريات الدم البيض والاجسام المضادة والخلايا البلعمية حيث ان الخلية البلعمية تبتلع البكتريا المكبسلة غير انها لا تهضم بل تتكاثر داخل الخلية فتحطمها لتخرج البكتريا سابحة .
2. تساعد في تجنب التاثيرات السريعة الناتجة من فقدان الماء او زيادته .

تزيد من امراضية البكتريا المكونة لها .

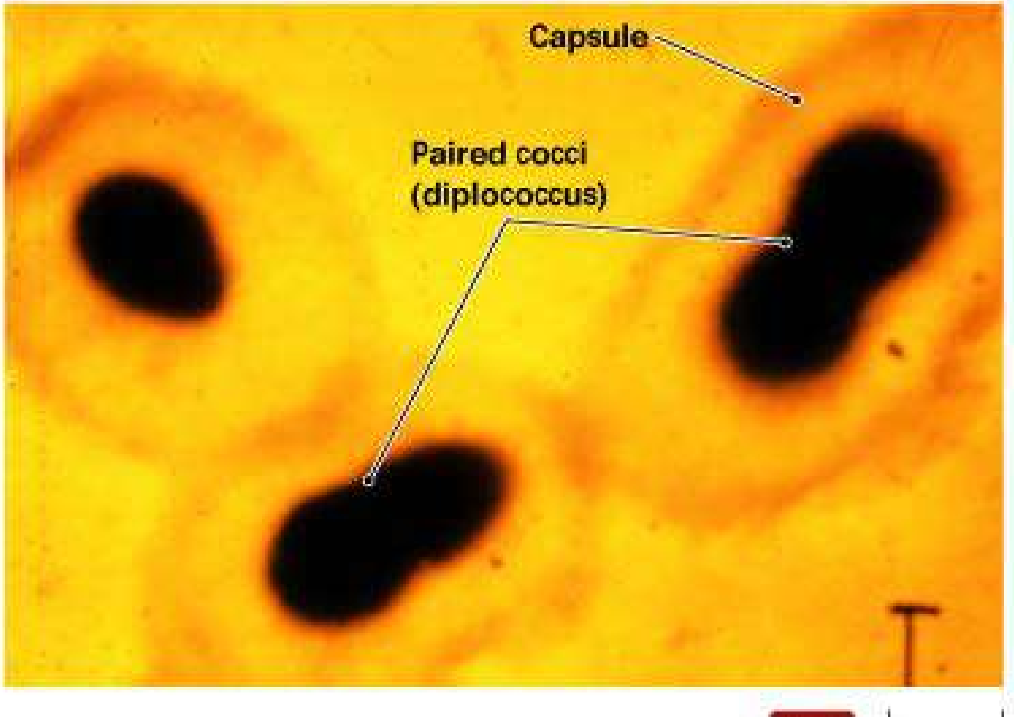
اهم البكتريا المرضية التي تحيط نفسها بكبسول هي :

1− المكورات الرئوية ***Diplococcus pneumoniae***

هي مكورات G^+ وتنتظم على شكل ازواج حيث تكون النهايات المدببة الى الخارج اما في النماذج المرضية يمكن مشاهدت الكابسول محيطة بها وهي بكتريا اختيارية (هوائية ولا هوائية) يتم عزلها على وسط غني مثل Chocolate agar وتحضن بدرجة حرارة 37 لمدة 18 ساعة تحت نسبة 5− 10% Co_2 .

العينات التي تؤخذ في حالة التشخيص المختبري هي البلغم Sputumوعند عدم امكانية الحصول على البلغم تؤخذ مسحة من منطقة البلعوم .

صورة رقم (46) الكبسول في المكورات الرئوية



الامراض التي تسببها للانسان :

- امراض ذات الرئة الفصي lobar-pneumoniae .
- الامراض القيحية كالتهاب السحايا meningitis وتسمم الدم toxemia .
- تسبب التهاب الجهاز التنفسي العلوي والسفلي كالتهاب الجيوب التنفسية والقصبات .
-
- **العلاج** Treatment
- تستخدم المضادات الحيوية :
- البنسلين Penicillin .
- التتراسايكلين Tetracyclin .
-
- **2- عصيات الجمرة الخبيثة** *Bacillus antharcis*
- وهي عصيات G^+ غير متحركة وتنتظم خلاياها اما بشكل مفرد او على شكل سلاسل وهي بكتريا مكونة للكابسول وقد تغطي السلسلة الخلوية بكاملها . كما انها تكون السبورات التي لا تتكون الا عندما تكون البكتريا نامية في التربة بوجود الاوكسجين لذا نادرا ما تتكون الابواغ في النسيج المصاب ويكون شكل السبور بيضوي الشكل Oval shape.
-

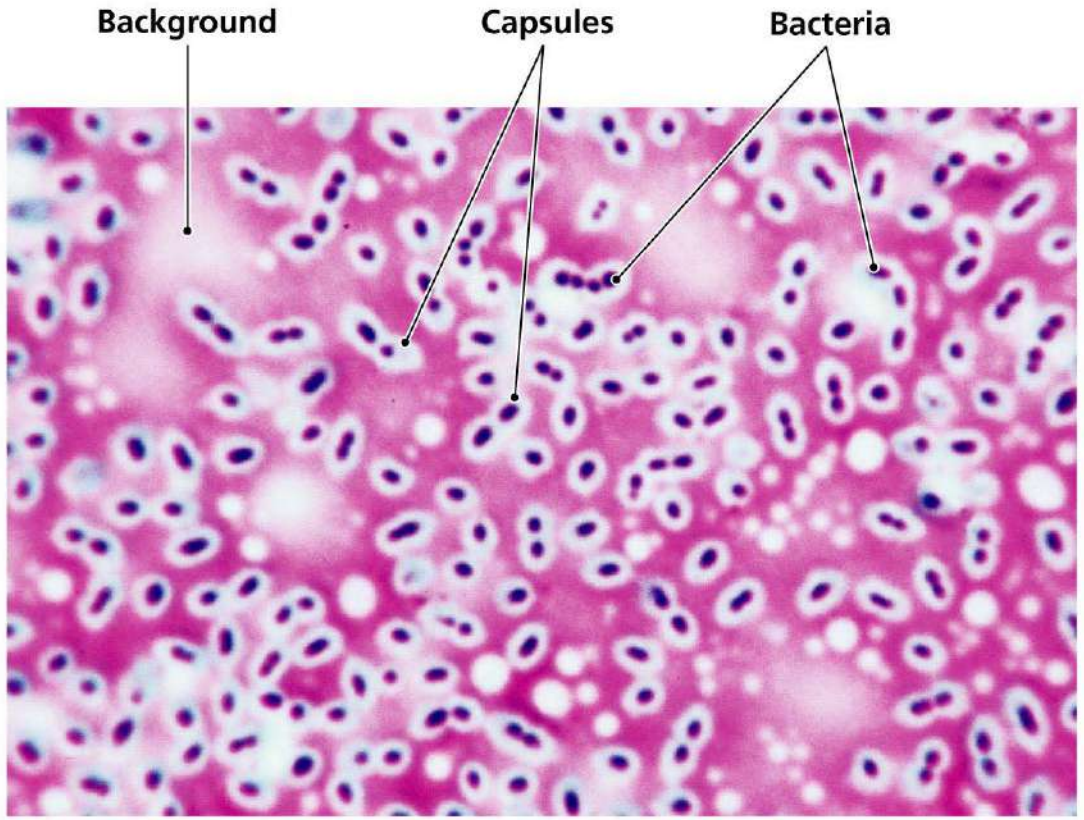
صورة رقم (47) عصيات الجمرة الخبيثة

Klebsiella pneumoniae الكلبسيلا –

وهي بكتريا عصوية G^- غير متحركة مكونة للكابسول توجد بشكل طبيعي في القناة الهضمية للانسان والحيوان ومن الامراض التي تسببها للانسان هي :

1. التهاب المجاري البولية Urinary Tract Infection .
2. التهاب القناة التنفسية Respiratory Tract Infection .
3. تسبب ذات الرئة Pneumonia .

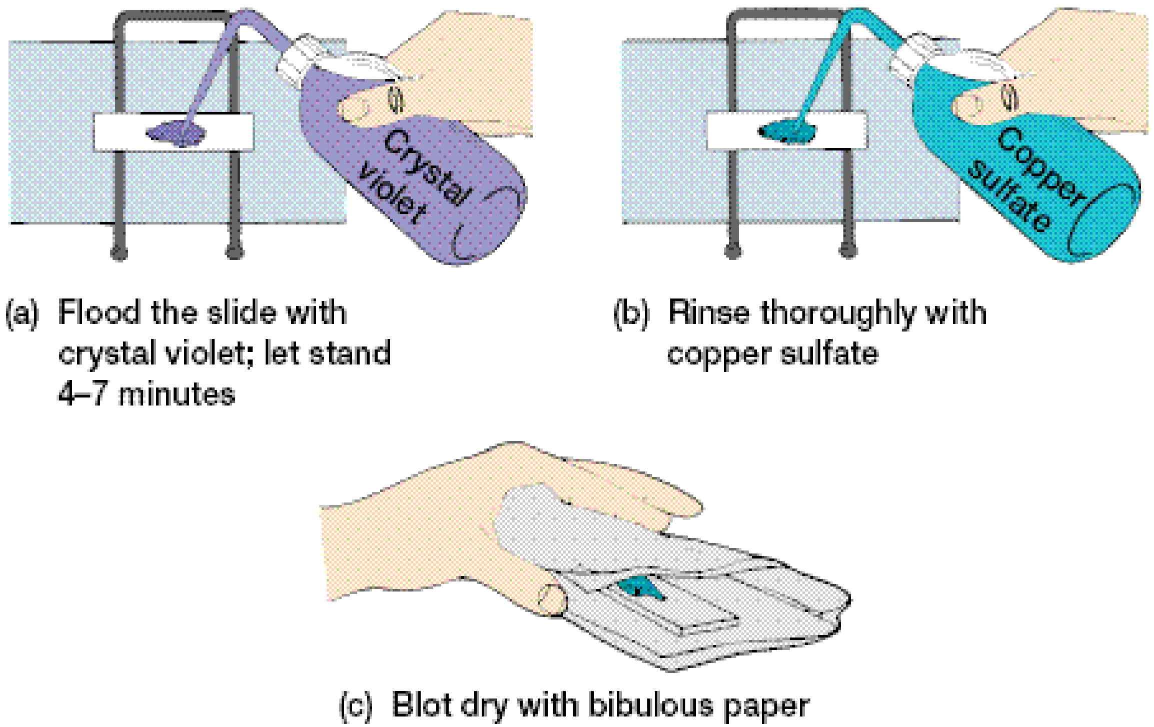
صورة رقم (48) الكبسول في عصيات الكلبسيلا



طريقة العمل باستخدام صبغة Hiss stain

- ناخذ مسحة من اللوزتين بواسطة swab معقم وتعمل مسحة على شريحة نظيفة ثم تجفف ولا تثبت على النار .
- تغمر الشريحة بصبغة Carbol –fuchsin بتركيز 1% لمدة (4-7) دقائق مع تسخين الصبغة وتجنب الغليان لتساعد على دخول الصبغة الى داخل البكتريا وتصبغها باللون الاحمر .
- تغسل الشريحة بكبريتات النحاس $CuSo_4$ بتركيز 20% لمدة (0.5-1) دقيقة .
- تترك الشريحة لتجف بالهواء وتفحص تحت المجهر .
- تظهر الخلايا ثنائية حمراء اللون اما الكابسول تظهر بلون اخضر مزرق هو لون $CuSo_4$ تحيط الخلايا الثنائية .
- ملاحظة :
- لا تغسل الشريحة بالماء مطلقا وذلك لان الكابسول لها القابلية على الذوبان بالماء لذلك تغسل فقط بكبريتات النحاس .
-

صورة رقم (49) طريقة Hiss stainالصبغ الكبسول

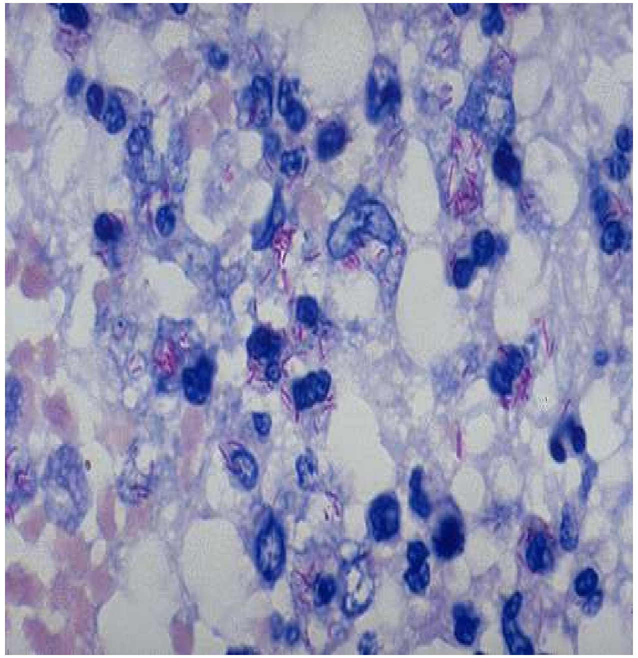


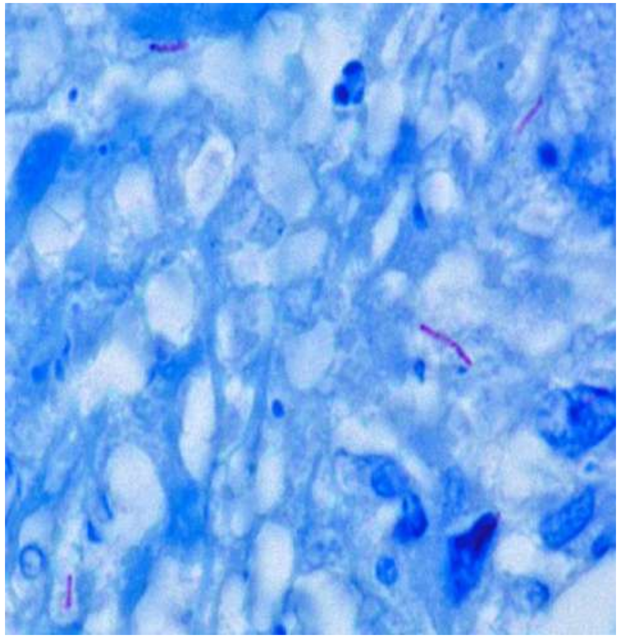
بكتريا السل (التدرن) *Mycobacterium tuberculosis(T.B)*

- التدرن من الامراض المعدية التي ما زالت تنتشر بنسبة عالية بين الناس في المجتمعات المختلفة وهذا المرض يسمى ايضا السل الرئوي والذي يصيب الانسان عند تعرضه لعصيات كوخ نسبة الى العالم كوخ وهو عالم الماني اكتشف هذا المكروب عام (1882) حيث وصف كوخ عصيات السل *M. tuberculosis* وبين علاقتها بمرض السل في الانسان . ويصيب هذا المرض اغلب اعضاء جسم الانسان كالرئتين ، الامعاء ، الكليتين ، الدماغ ، العظام ، المفاصل ، الجهاز التناسلي وقد تصاب به العين والبلعوم ايضا .
- وهي عصيات نحيفة صامدة للحامض acid fast متباينة في الشكل ، عديمة الحركة ، عديمة الابواغ ، هوائية (aerobic) وتنتظم بصورة مفردة او في مجاميع صغيرة .
- تتم العدوى بواسطة الاستنشاق للرذاذ المتطاير الذي يخرج مع السعال والبصاق محملا بالميكروب او كما يحدث في عادة التقبيل مثلا او قد تتم العدوى بطريقة غير مباشرة وتكون الوسيلة في هذه الحالة الذرات التي تخرج مع السعال والبصاق والتي يحملها الهواء او الغبار ويستنشقها الشخص السليم ويصاب بالمرض . السل تسببه انواع تابعة لجنس Mycobacterium وهي :
- Order : Actinomycetales
- Family : mycobacteriaceae
- Genus : Mycobacterium
- Sp . : tuberculosis يصيب الانسان بالسل الرئوي

Sp : bovis يسبب السل البقري ويمكن ان ينتقل للانسان
Sp. : avium يسبب السل في الطيور
Sp.: leprae يسبب مرض الجذام
Sp. : micrest تصيب الفئران

صورة رقم (50) عصيات السل





صبغ عصيات السل

لا تصبغ بسهولة بالاصباغ الاعتيادية ولكن هنالك صبغة خاصة بها تعرف بصبغة زيل نيلسن Ziehl –neelesen's stain وهي صبغة الكاربول فوكسين Carbol-Fuchsin وتدعى كذلك بالصبغة المقاومة للاحماض Acid Fast stain .

احتواء جدار الخلية البكتيرية على طبقة سميكة من المواد الشمعية والدهون Waxy lipids هذا يكون مسؤولا عن احتفاظ العصيات للصبغة خلال خطوات صبغ العصية حتى لو استخدمت الحوامض لازالة الصبغة وهذا ما يميزها عن غيرها من الجراثيم لذا سميت بالعصيات المقاومة للاحماض Acid Fast Bacilli ولهذا سميت الصبغة بـ Acid Fast stain خلال عملية الصبغ نحتاج الى اذابة طبقة الدهون عن طريق التسخين التدريجي فبذلك تدخل الصبغة ثم تعود هذه الدهون من جديد وبشكل ذاتي الى طبيعتها الاصلية .

تشخيص الاصابة بعصيات السل

- يعد اختبار Tuberculin Skin Test من اول الاختبارات المناعية في تشخيص مرض السل والذي استخدم في عام 1907 والمعتمد على ما يسمى بـ Koch's Old Tuberculin (OT) المحظر من جرثومة العصيات المقتولة بالحرارة واعتمدت فكرة الاختبار على حقن المستضد المحضر (OT) في جلد المصابين بهذه الجرثومة مما ينتج عنه تكوين منطقة التهاب حمراء في مكان الحقن وهي احدى مظاهر فرط الحساسية المتاخرة Delyad Hypersensitivity type استمرت بعد ذلك محاولات عديدة لاعداد مستضد بديل عن (OT) ويكون اكثر تخصصا ودقة في التمييز بين حالات السل الفعالة وبين اصابات سابقة واهم هذه المحاولات كانت سنة 1934 باعداد مستضد (PPD) Purified Protein Derivativesالذي تم الحصول عليه من ترشيح عصيات السل ثم ترسيبها بواسطة كبريتات الامونيوم .
- الفحص المجهري لعينات القشع .
- الزرع .
-

طرق العدوى

- **- العدوى عن طريق الفم**
- وفي هذه الحالة نجد ان الميكروب يقاوم احماض المعدة ويصل الى الامعاء وهذا يحدث عند ابتلاع ماكولات مثل اللحم من حيوانات مصابة وكذلك قد يصل الميكروب عن طريق شرب اللبن والحليب الملوث غير المبستر ، وتنتقل المرض ايضا بواسطة الادوات الملوثة .
- **2- العدوى عن طريق الجلد**
- ان العدوى عن طريق الجلد غير شائعة نسبيا ويمكن ان تحصل اما عن طريق (كشط) abrasion بسيط خلال مسك مادة ملوثة او غذاء مصاب او ابرة ملوثة او سكين ملوث مثلا .
- مدة الحضانة : يتراوح مدة الحضانة من 4-6 اسابيع .
-

السيطرة على المرض

- الحث على تلقيح الاطفال حديثي الولادة بلقاح BCG لاكسابهم مناعة ضد المرض .
- تشخيص الاصابة باستخدام طرق التشخيص مثل اخذ اشعة للصدر واجراء فحص (PPD) واستخدام صبغة Ziehl – Neelson .
- معالجة الاشخاص المصابين بالامراض المزمنة الاخرى لانهم يمثلون المصادر المهمة للاصابة بالتدرن وذلك لضعف جهازهم المناعي .
- الاشراف الصحي على الابقار لمنع الانتشار *M. Bovis* المسبب الرئيسي لمرض السل البقري .
- بسترة الحليب للقضاء على عصيات السل في حالة اصابة الابقار بالمرض .
-
- **لقاح B.C.G.**
- هذا اللقاح عبارة عن عصيات سل حية ومضعفة يعرف (Bacille – Calmette – Guerin) ويستخدم البكتريا التي تسبب السل البقري حيث تكون قد فقدت ضراوتها نتيجة زراعتها عدة مرات حوالي 130 مرة على الاوساط الزرعية بحيث فقدت قدرتها على احداث المرض . يحقن في الجسم المستضد تعمل على تكوين الاجسام المضادة داخل الجسم ففي حالة تعرض الجسم لهذه البكتريا . فان هنالك اجسام مضادة متكونة ضد المرض تمنع الاصابة وهذا اللقاح فعال بنسبة 80% يستمر لعدة سنوات .

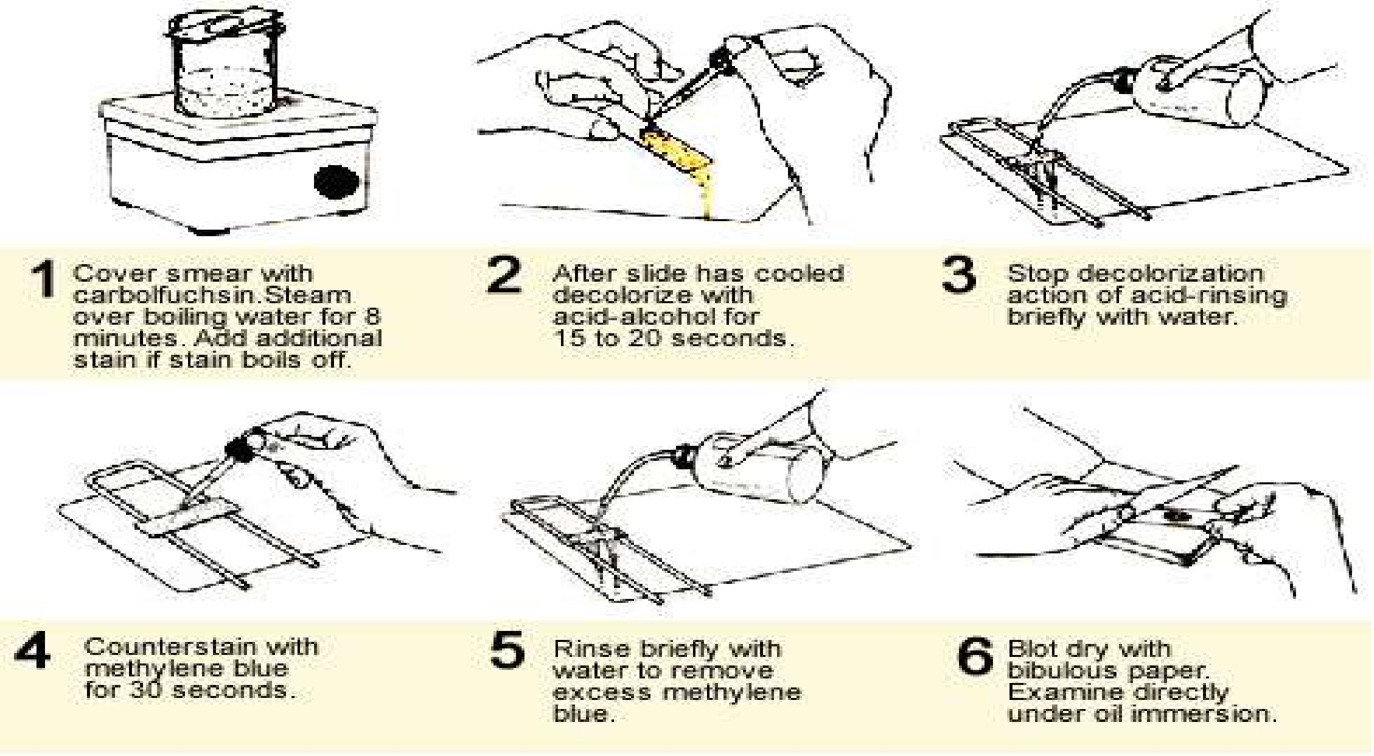
العلاجTreatment

- ان المعالجة في حالات التدرن تسعى الى تحقيق عدة اهداف منها :
- تحويل الحالات الموجبة (فحص القشع والزرع الى حالات سالبة في اقصر فترة زمنية ومن ثم المساعدة في عدم انتشار المرض) .
- منع ظهور المقاومة العلاجية .
- التاكد من الشفاء وعدم حصول الانتكاس .
- من اهم العلاجات والمضادات المستخدمة
- Rifampcin .
- Pyrazinamid (PZA)
- Ethambutol
- Streptomacyin
- Paraamino Sali cylic acid (PAS)
- Capereo mycin
- Kana mycin
- Ethionamid

كيفية صبغ بكتريا (T.B)

- العينات المستخدمة هي القشع Sputum حيث تؤخذ كمية من القشع وتفرش على شريحة زجاجية نظيفة وتجفف وتثبت على النار .
- تتم عملية صبغ البكتريا كما يلي :
- تغطى المسحة بصبغة Carbol fuchsin ويعرض السلايد الى اللهب لتسخين الصبغة مع تجنب غليانها وجفافها تستمر العملية لمدة 5 دقائق في حال جفت الصبغة يتم اضافة المزيد من الصبغة الى ان تنتهي الفترة المحددة .
- بعدها يبرد السلايد ثم يقصر بواسطة الكحول الحامضي Acid –alcohol باضافة قطرة قطرة مع امالة الشريحة حتى يصبح الكحول الحامضي الذي يسقط عديم اللون .
- تغسل الشريحة بالماء لفترة قصيرة لازالة اثر الكحول الحامضي .
- تضاف صبغة المثيل الازرق methylene blue لمدة (1-2) دقيقة .
- ثم تغسل بالماء لفترة قصيرة .
- يجفف السلايد بورق النشاف ثم تفحص مباشرة تحت العدسة الزيتية Oil immersion .
- ملاحظة : ان عملية المعاملة مع الكحول الحامضي هي لازالة صبغة الكاربول فوكسين من خلايا النسيج المحيطة بالبكتريا وبعض انواع البكتريا الاخرى غير المقاومة للاحماض ، فتبقى بكتريا السل محافظة على صبغة الكاربول فوكسين الحمراء .

صورة رقم (51) كيفية صبغ عصيات السل



Ziehl-Neelsen acid-fast staining procedure

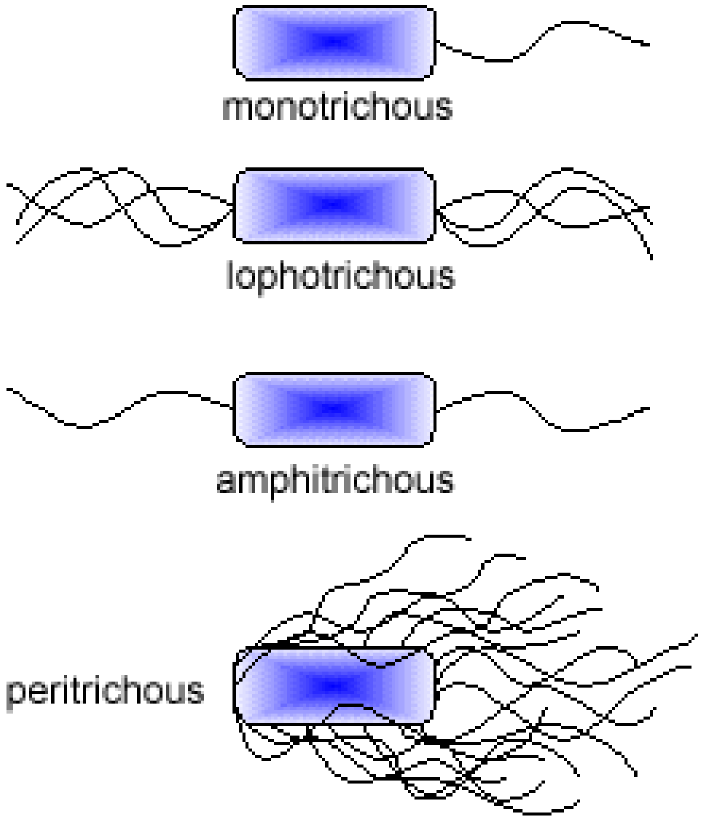
الكشف عن حركة البكتريا Motility of Bacteria

- بصورة عامة تنقسم البكتريا الى قسمين رئيسيين منها ما تكون متحركة Motile حركة حيوية حقيقية والبعض الاخر تكون غير متحركة . وهذه الحركة تعزى الى وجود اعضاء للحركة تسمى (الاسواط) Flagella . ويمكن دراسة حركة البكتريا بالفحص المجهري لخلايا البكتريا غير المصبوغة بواسطة تحضير القطرة المعلقة Hanging drop ويجب التمييز بين الحركة الحقيقية الحيوية للبكتريا وهي حركة تقدمية وبين الحركة البروانية Brownian Motile وهي حركة تذبذبية للامام والخلف لاي جسم صغير سواء كان حيا او ميتا نتيجة لاصطدام جزئيات السائل بهذا الجسم دون ان يغير وضع الجسم بالنسبة للاجسام الاخرى العالقة في السائل .
- **الاسواط : flagella**
- وهي عبارة عن زوائد خيطية تنشا من سايتوبلازم الخلية وليس من الغلاف Flagellum مفردها ويختلف سمك السوط حسب نوع البكتريا حيث Flagelline الخلوي تتركب من بروتين الفلاجلين يتراوح قطره ما بين 12 – 30 نانوميتر وايضا يختلف الاسواط من حيث اعدادها وترتيبها على سطح الجدار للخلايا البكتيرية .

يمكن تقسيم البكتريا من حيث اعداد الاسواط الموجودة على سطحها الى :

- تحوي سوط واحد Monotrichous .
- تحوي عدة اسواط Multirichous .
- اما من حيث ترتيب الاسواط يمكن تقسيم البكتريا الى :
- بشكل حزمة من الاسواط في احد طرفي الخلية البكتيرية Lophotrichous .
- تكون منتشرة على جميع سطح الجدار الخلوي للخلية البكتيرية Peritrichous .
- او تحوي الخلية على سوطين في قطبي الخلية البكتيرية Amphitrichous .

صورة رقم (52) الاسواط في الخلايا البكتيرية



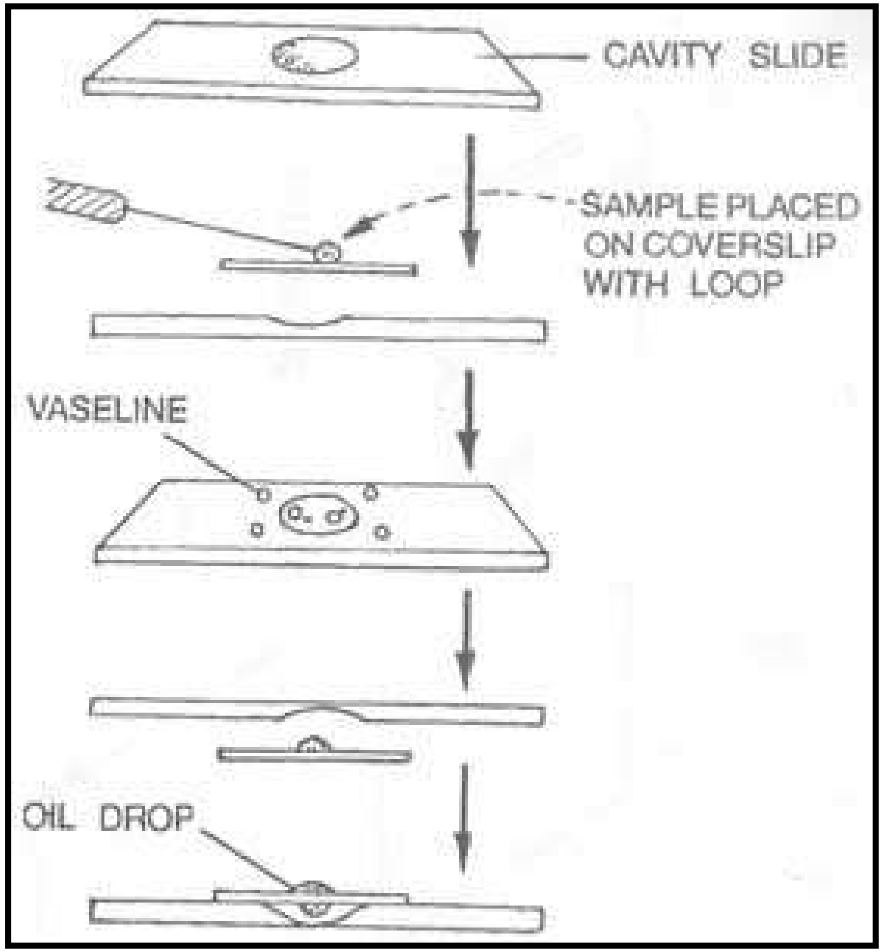
طرق الكشف عن حركة البكتريا

- **هناك عدة طرق للكشف عن حركة البكتريا من هذه الطرق :**
- الطريقة المباشرة (طريقة القطرة المعلقة Hanging drop) .
- الطريقة غير المباشرة (طريقة الزرع في الاوساط الغذائية نصف الصلبة) . Semi solid nutrient culture method .
-
- **1- الطريقة المباشرة (طريقة القطرة المعلقة Hanging drop)**
- عادة يتم استخدام شريحة زجاجية خاصة تحوي على تقعر في وسطها حيث يتم تحضير قطرة معلقة من مزرعة بكتيرية سائلة لبكتريا متحركة مثل *E. coli* او *Proteus sp* وتتم العملية كما يلي :
- المواد اللازمة :
- مزرعة بكتيرية سائلة لبكتريا متحركة *E. coli*.
- شريحة زجاجية ذات تقعر في الوسط .
- غطاء شريحة زجاجي Cover slide .
- زيت فازلين .
- لوب Loop .
- مصباح بنزن .
-

طريقة العمل

- انقل بواسطة الناقل (Loop)المعقم قطرة من مزرعة البكتريا السائلة ويراعى ان تكون نشطة (عمرها 18-24 ساعة) . وتوضع هذه القطرة في وسط غطاء الشريحة الزجاجي . اما في حالة المزرعة الصلبة فيجب تحضير معلق بكتيري باستخدام الماء المقطر المعقم او محلول فسلجي معقم .
- توضع اربع قطرات من الفازلين على كل زاوية من زوايا الغطاء الزجاجي الاربعة والغاية منها تثبيت الشريحة المقعرة على الغطاء وعدم يتخبر القطرة المعلقة اثناء الفحص .
- اقلب بهدوء وحذر الشريحة المقعرة فوق غطاء الشريحة بحيث تكون القطرة المعلقة في منتصف التقعر مع تجنب تلامسها مع الشريحة .
- بعد التصاق غطاء الشريحة بالشريحة المقعرة تقلب الشريحة ونفحص تحت العدسة الصغرى يحرك المنظم الكبير حتى تظهر حافة القطرة المعلقة في منتصف الحقل ، ونظرا لان القطرة شفافة فان حافتها لا تظهر واضحة اذا كانت الاضاءة شديدة لذلك يجب تقليل الاضاءة عند الفحص .
- تفحص القطرة المعلقة تحت العدسة 40 فقط حيث يمكن ملاحظة البكتريا وهي تتحرك حركة تقدمية الى الامام ويجب تمييزها عن الحركة البروانية التي هي حركة الجزئيات .
- ارسم ما تشاهده .

صورة رقم (53) القطرة المعلقة



الطريقة غير المباشرة (طريقة زرع وسط نصف صلب)
Inoculation in semi solid media

- - يلقح انبوب حاوي على وسط نصف صلب باستخدام ابرة التلقيح الـ Needle بطريقة الوخز او الطعن في وسط الاكار العميق Deep agar .
- 2- يحضن الانبوب المزروع بدرجة حرارة 37م لمدة 18-24 ساعة .
- 3- يتم ملاحظة البكتريا المتحركة تنتشر وتنمو خارج خط التلقيح يكون نموها في جميع الاتجاهات اما البكتريا غير المتحركة فيكون نموها يكون ضمن خط التلقيح .

الاشكال البكتيرية وتجمعاتها

دكتورة ضحى جاسم محمد

الاشكال البكتيرية وتجمعاتها

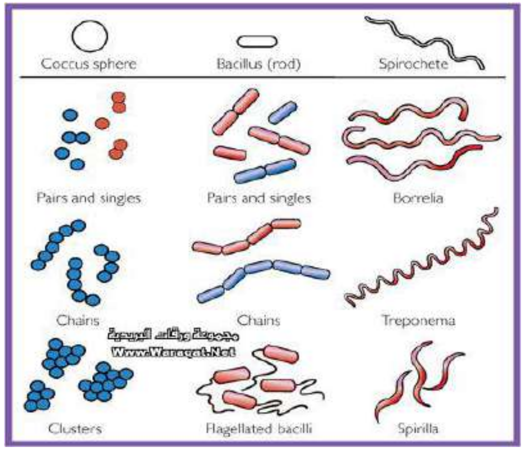
تتضمن دراسة الشكل المظهري للخلية البكتيرية معرفة شكلها وحجمها وطرق تجمعها . وعموما الخلية البكتيرية لا تختلف كثيرا من ناحية التركيب الخليوي عن خلايا الكائنات الاخرى وحيدة الخلية . ولكن نظرا لصغر حجمها يتم دراستها بالفحص المجهري بعد معاملتها بالاصباغ البسيطة او المركبة وذلك للتعرف على اجزاء الخلية المختلفة اوتتم دراستها في تحضيرات جافة غير مصبوغة عند استعمال المجهر الالكتروني للتعرف على الاجزاء او المكونات الدقيقة للخلية البكتريا الحقيقية ذات شكل بسيط جدا ولها اربعة اشكال رئيسية :

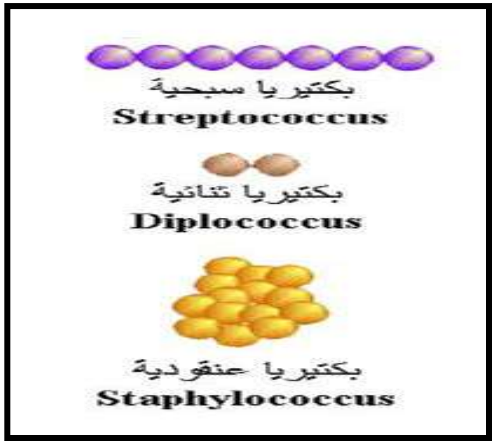
الاشكال البكتيرية وتجمعاتها

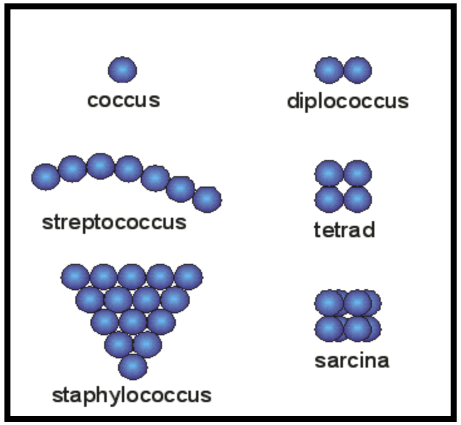
١. الشكل الكروي Spherical shape

الاسم العلمي cocciومفردها (coccus) يكون شكل الخلية كروي ولو انها في بعض الحالات قد تكون بيضوية الشكل كالمكورات الرئوية Pneumococcusوالمكورات المعوية Enterococcusوالتي تصنف مع المكورات واستنادا الى طريقة انقسامها فان المكورات قد تنتظم على هيئة عناقيد (المكورات العنقودية) (Staphylococcus) او على هيئة سلاسل (المكورات السبحية) (Streptocccus) او زوجية المكورات الزوجية Diplococcusوقد تنتظم في مجاميع رباعية تتكون من اربعة خلايا تدعى (الرباعيات tetrads) او تنتظم بشكل ثمانية خلايا تدعى (sarcinia) . كما انها تتميز حسب قابليتها للصبغ بطريقة كرام واغلبها تكون موجبة لهذه الصبغة (تاخذ اللون البنفسجي) عدا مجموعة قليلة فهي سالبة لصبغة كرام (تاخذ اللون الوردي) ومنها الجنس (*Neisseria sp.*) واكثر افراد هذا الجنس متطفلة و ممرضة ومنها ما يسبب التهاب السحايا للمخ *Neisseria meningitidis*ومنها ما يسبب السيلان *Neisseria gonorrhoea*_

الاشكال البكتيرية وتجمعاتها



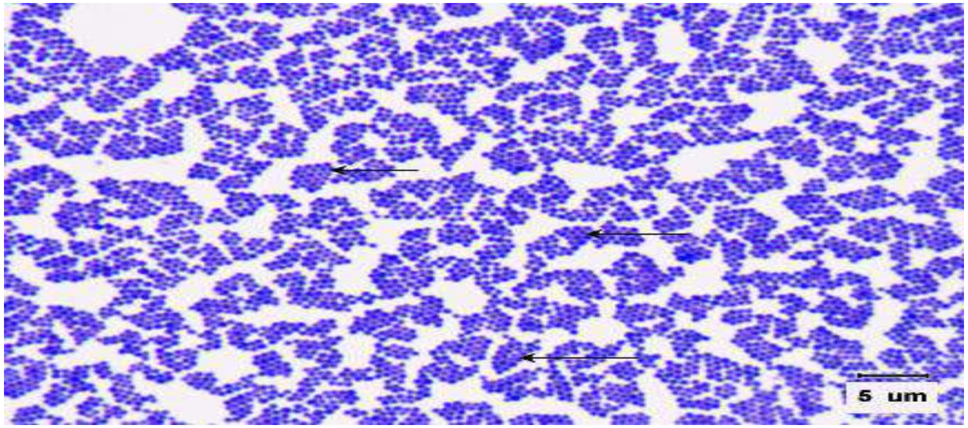




الاشكال البكتيرية المختلفة

البكتريا الكروية العنقودية ***Staphylococcus***

Staphylococcus aureus .
Staphylococcus epidermidis .
Staphylococcus Saprophyticus

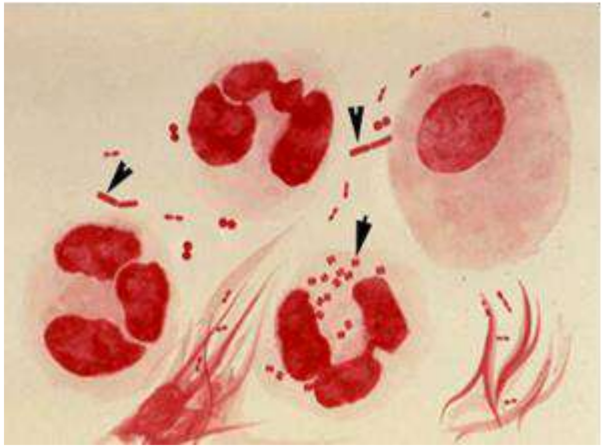


البكتريا العنقودية

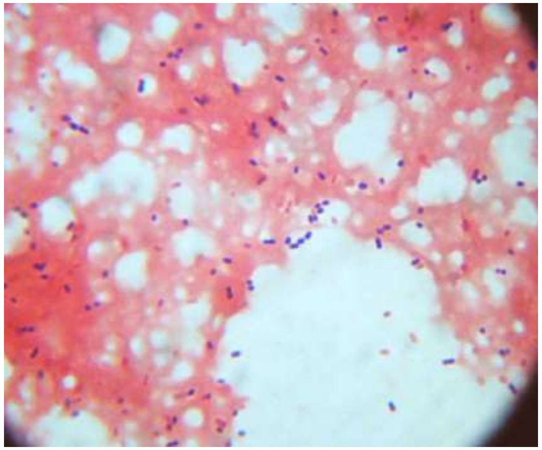
المكورات الزوجية Diplococcus

المكورات الموجبة لصبغة كرام *Diplococcus pneumonia* .

السالبة لصبغة كرام *Neisseria meningitidis , Nessieria gonorrhoea*



المكورات الزوجية السالبة لصبغة كرام



المكورات الزوجية الموجبة لصبغة كرام

المكورات السبحية Streptococcus

- *Streptococcus pyogens .* تسبب الروماتيزم الحمى القرمزية
- *Streptococcus salvarius .* توجد في الفم
- *Streptococcus viridans .*
- *Streptococcus faecalis .* توجد في الخروج

المكورات السبحية

الشكل العصوي Rod –shaped

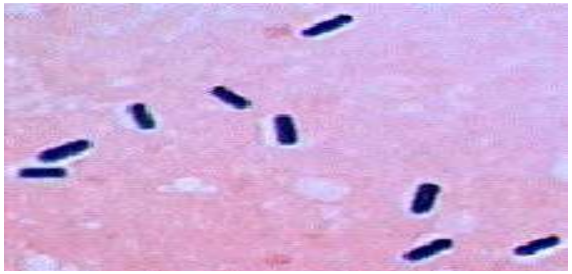
الاسم العلمي Bacilli ومفردها (Bacillus) والبكتريا العصوية تقسم الى عصوية قصيرة Short rod وطولها يقارب عرضها ، وعصوية طويلة Long rodويبلغ طولها ٣-١٠ امثال عرضها والبكتريا العصوية قد تكون مستوية او على شكل عصا الطبل اما من حيث الاستقامة فقد تكون مستقيمة او قد تكون مقوسة او تميل الى الانحناء . وتقسم البكتريا العصوية الى قسمين بالنسبة لتفاعلها مع صبغة كرام فمنها ما تكون موجبة لصبغة كرام ومنها السالبة وعموما فان البكتريا العصوية تشمل عددا كبيرا من العوائل المهمة والبكتريا العصوية قد تكون مفردة او بشكل مزدوج او على شكل سلاسل .

البكتريا العصوية الموجبة لصبغة كرام

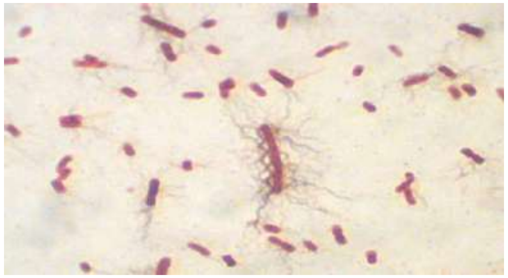
- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus anthracis*
- *Clostridium tetani*
- *Clostridium septicum*
- *Clostridium perfringens (welchii)*
- *Corynebacterium diphtheriae*
- *Listeria monocytogenes*
- *Lactobacillus acidophlus*

البكتريا العصوية السالبة لصبغة كرام

- *Salmonella typhi*
- *Salmonella typhimurium*
- *Salmonella paratyphi A, B*
- *Shigella shiga*
- *Shigella flexneri*
- *Haemophylus influenzae*
- *Bordetella pertusis*
- *Proteus vulgaris*
- *Proteus mirabilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Brucella abortus*
- *Brucella melitensis*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*

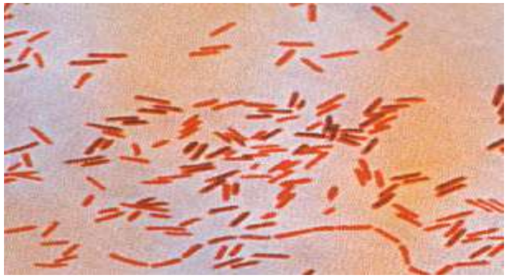


Bacillus sp

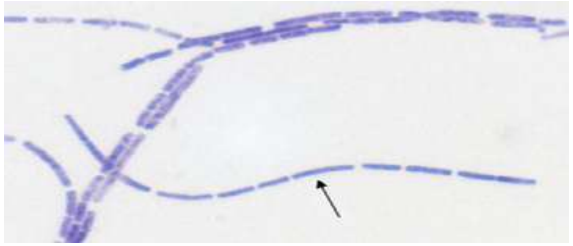


Proteus sp

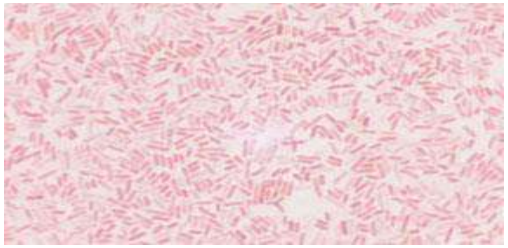
Clostridium sp



Salmonella sp



Lactobacillus sp

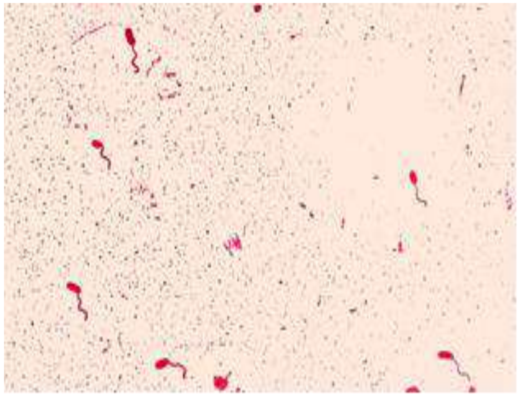


E. coli

الشكل الحلزوني Spiral shape

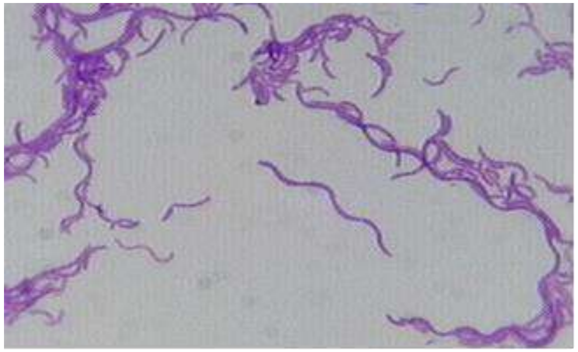
والاسم العلمي spirillum وجمعها spirilla وتقسم البكتريا الحلزونية الى :

- أ- مجموعة تاخذ شكل حرف الواو وتسمى بالمجموعة الواوية او الضمية Comma حيث تظهر البكتريا العصوية انحناء واحد وتبدو الخلية على شكل الحرف ومن الامثلة عليها البكتريا المسببة للكوليرا
- *Vibrio cholerae*
- *Vibrio eltor*
- *Vibrio fischeri*



بكتريا الكوليرا

مجموعة تاخذ شكل بريمي Corecks crew وتحتوي خلاياها على عدة انحناءات وتاخذ شكل الحلزون او البريمة spirillum واغلب انواع هذه البكتريا يعيش في الماء . ويمكن التمييز بين البكتريا الواوية والبريمية من حيث الاسواط التي تستخدمها في حركتها حيث تكون الاسواط في الاولى في قطب واحد من الخلية في حين الاسواط في البكتريا البريمية توجد في كلا القطبين ومثال على البكتريا البريمية *Spirillum minus* التي تسبب مرض حمى عض الجرذان .

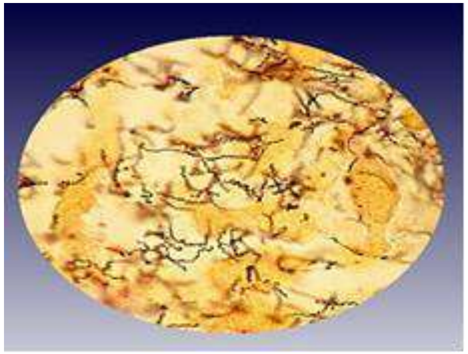


بكتريا عض الجرذان

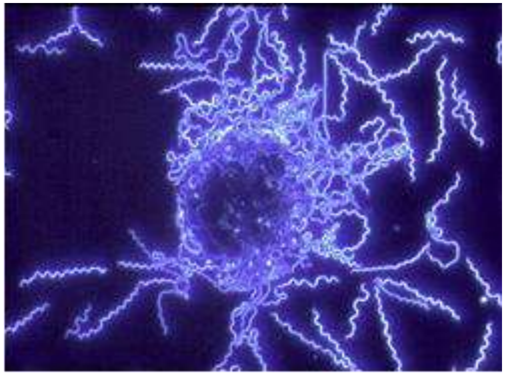
مجموعة تكون لولبية الشكل Spirochaetes وهي بكتريا غير حقيقية أي ان خلاياها تحتوي على عدة انحناءات ومن الامثلة عليها

- *1- Treponema pallidum* السفلس
- *2- Borrellia recurrentis* الحمى الراجعة

اما بالنسبة لتفاعلها مع صبغة كرام فان كافة انواع المجموعة الاولى والثانية والثالثة سالبة لصبغة كرام .



Treponema pallidum



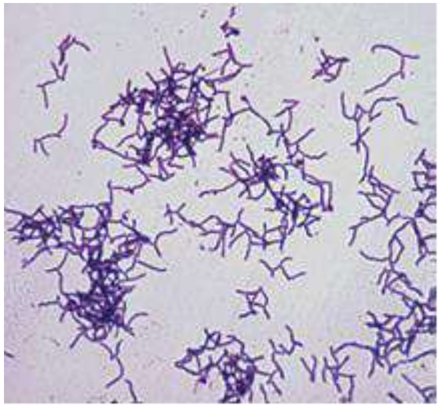
Borrellia recurrentis

الشكل الخيطي Mycelium formation

تتميز افراد هذه العائلة بتكوين مايسليوم حقيقي والذي يتجزء في الاطوار المتاخرة من النمو الى اجزاء (fragments) عصوية او دائرية وتتكون هذه العائلة من جنسين هما :

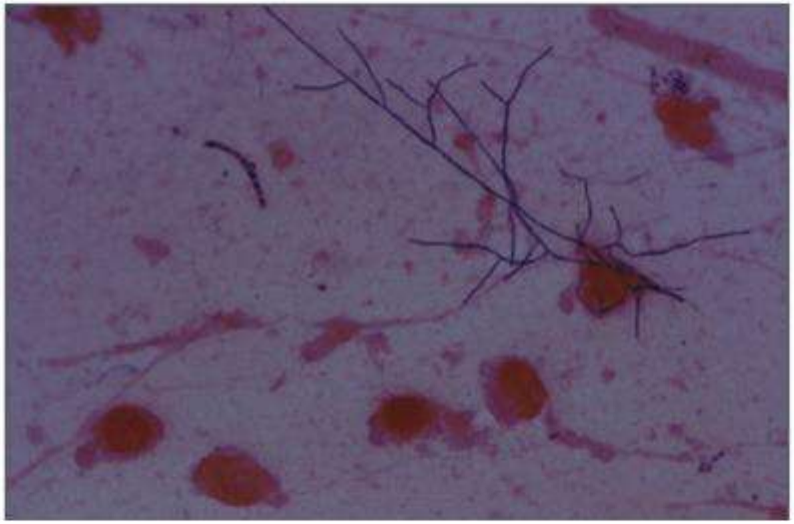
- Actinomyces : بكتريا عصوية موجبة لصبغة كرام هوائية ولا هوائية لا تكون كونيدات بعض انواعها ممرضة للانسان والحيوان

- *1- Actinomyces israellii*
- *2- Actinomyces viscosus*
- *3- Actinomyces naeslundii*



- Nocardia : بكتريا عصوية موجبة لصبغة كرام هوائية ، بعض انواعها ممرضة للانسان والحيوان

- *1- Nocardia madurae*
- *2-Nocardia bresiliensis*
- *3-Nocardia asteroides*



الفصل الخامس

المضادات الحيوية واختبارات تشخيص العزلات الجرثومية

Your text here

د. محمد عبدالاله الشكرجي

المضادات الحيوية Antibiotics

المضادات الحيوية عبارة عن مواد كيمياوية مستخلصة من الاحياء المجهرية لها القدرة على ايقاف نمو وحتى قتل الاحياء المجهرية الاخرى .

يعود تاثير هذه المضادات على الميكروبات الى ان بعضها يؤثر على عملية الانقسام والبعض يؤثر على التنفس ، والبعض يؤثر على عمليات التمثيل الغذائي للخلية ، فمثلا البنسلين يؤثر على الجدار الخلوي مما يؤدي الى منع عملية الانقسام والى استطالة الخلية ، كما يؤثر على درجة نفاذية الغشاء السايتوبلازمي ويمنع تمثيل البروتين بالخلية ن اما الستربتومايسين Streptomycin والكلورامفينكول Chloramphenicaol يؤثران على عملية التنفس وعلى عملية البروتين بالخلية ، وهكذا فاننا نجد ان لكل مضاد التاثير الخاص به .

ويرجع الفضل في اكتشاف هذه المواد الى العالم الانكليزي (Alexander Fleming) 1929م الذي اكتشف البنسلين (Penicillin) ثم توالت بعد ذلك الاكتشافات التي كان من ابرزها ما قام به waksman Selman ومساعدوه سنة 1940 من تحضير الـ Streptomycin وقد امكن بعد ذلك تحضير الكثير من المضادات الحيوية بحالة نقية ، ونظرا لاهمية المضادات الكبيرة من حيث قيمتها العلاجية ، فقد ظهر العديد منها نتيجة للبحوث التي اجريت والتي ما زالت مستمرة ، وتتجه البحوث دائما للكشف عن مضادات جديدة ذات فعالية عالية ضد الميكروبات خصوصا تلك التي اصبحت لا تتاثر بالمضادات التي كانت شائعة الاستعمال ، نتيجة تكون طفرات جديدة مقاومة لها ، ويجب ان ندخل في الاعتبار ان لجميع المضادات اثار سامة محدودة على الانسان والحيوان علاوة على ان بعضها يسبب مشاكل من حيث حساسية بعض الافراد لها مهما انها تسبب قتل الميكروفلورا النافعة الموجودة طبيعيا بالقناة الهضمية التي تقوم بتجهيز الفيتامينات اللازمة للجسم (مما يلزم اعطاء العائل كميات كافية من الفيتامينات خاصة التابعة لمجموعة ب) كل هذا يؤكد ضرورة استعمال هذه المضادات بحرص وتحت اشراف طبي . وعموما فانه كلما كان المضاد المستعمل ذو مجال ميكروبي واسع (wide spectrum) أي انه يؤثر على عدد كبير من الميكروبات مثل البكتريا الموجبة لصبغة والبكتريا السالبة لصبغة كرام . والفيروسات والبكتريا المقاومة للاحماض والريكتسيا .... الخ كلما كانت له قيمة علاجية كبيرة .

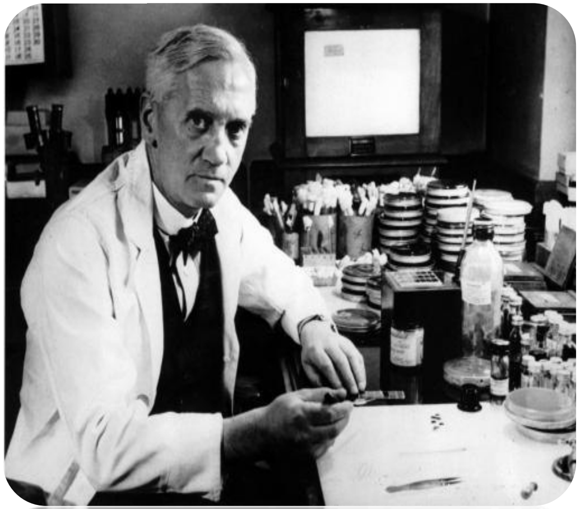
من المجاميع الكيمياوية التي تستعمل داخليا في علاج الامراض البكتيرية في جسم العائل مركبات السلفانيلاميد والمضادات الحيوية وعموما فانه يشترط في المواد التي تستعمل داخليا كمواد علاجية Chemotherapeutic drugs ما يلي :

1- ان تكون قادرة على ابادة الطفيلي او ايقاف نشاطه دون الاضرار بخلايا العائل (Host) .

2- ان تكون لهذه المواد القدرة على الامتصاص والدخول الى الخلية البكتيرية بدرجة اكبر من الخلية الحيوانية ، حتى تكون خلايا العائل محمية بقدر الامكان من التاثير السام .

3- ان تكون على درجة عالية من الثبات بحيث لا تفسد من تاثير سوائل الجسم الغنية بالبروتينات .

4- ان لا تتدخل او تؤثر على الطرق الدفاعية لجسم العائل مثل كريات الدم البيضاء والاجسام المضادة .



العالم الكسندر فلمنك

تقسم المضادات الحياتية بالاعتماد على :

اولا : فعاليتها

فقد تكون قاتلة مميتة للبكتريا Bacteriocidal مثل مجموعة البنسلينات قد تكون مثبطة او موقفة لنمو البكتريا Bacteriostatic مثل Tetracycline .

ثانيا : موقع تاثير المضاد الحيوي

1- تدمير الجدار الخلوي للبكتريا وبذلك سوف يصبح نفاذا للماء وبالتالي انفجار الخلية .

2- تحطيم الغشاء البلازمي .

3- تعطيل عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية وايقاف نموها .

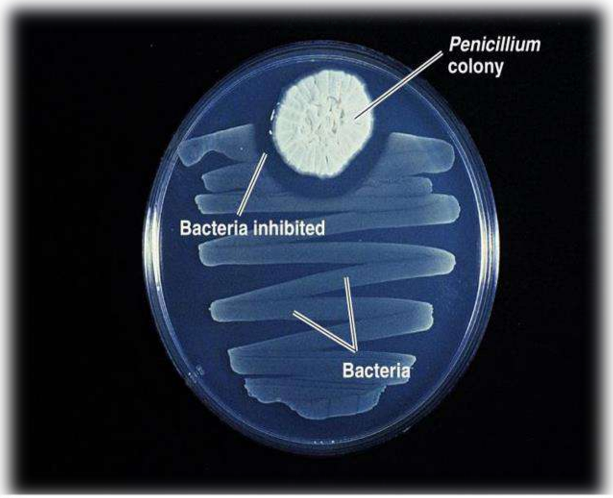
4- تدمير الحامض النووي (DNA) ويمنع تكاثرها وبالتالي موتها .

فطر *Penicilium notatum*

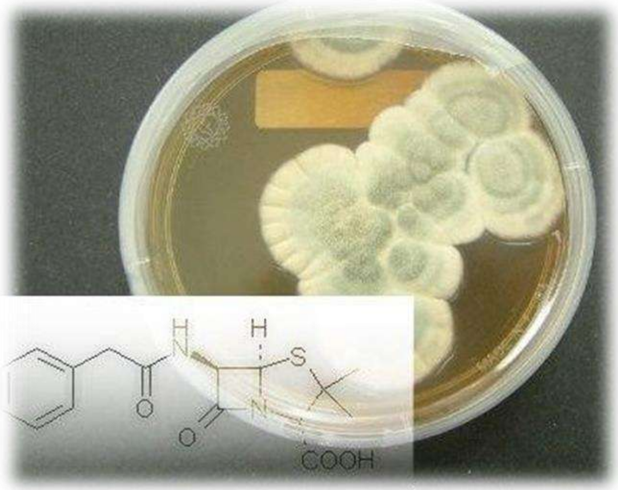
ثالثا : بالاعتماد على مصادرها

1- مصادر بكتيرية مثل جنس الـ *Bacillus sp* خاصة التي تنتج الـ Polymyxin وكذلك *Bacillus polymyxa* التي تنتج الـ Bactracin حيث يؤثر على جدار الخلية البكتيرية وجنس *Actinomycetes sp* وجنس *Streptomyces sp* .

2- الفطريات او الاعفان مثل البنسليوم *Penicilliuum* الذي ينتج المضاد الحيوي البنسلين *Penicillium notatum* .



التاثير التثبيطي للفطر على نمو البكتريا



مستعمرات فطر البنسيليوم

مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية

ان كثرة استعمال المضادات الحيوية بصورة عشوائية ومتكررة ادى الى جعل البكتريا مقاومة للعديد من المضادات الحياتية وهذه تعد مشكلة طبية كبيرة اذ اصبح من الصعب معالجة ابسط انواع الالتهابات وبالتالي ادى الى الحاجة لتصنيع وتطوير انواع مختلفة اخرى للمضادات الحياتية للقضاء على البكتريا لذلك فيجب الحذر عند استخدام المضاد الحيوي واجراء الفحوص السريرية والتشخيصية لاي حالة مرضية معينة مثل فحص الحساسية للمضادات الحيوية قبل اعطاء أي علاج للحصول على نتائج جيدة وسريعة في الشفاء .

الاعراض الجانبية للمضادات الحياتية

على الرغم من الاهمية الطبية للمضادات الحيوية واهميتها في قتل البكتريا الا ان هناك العديد من المحاذير التي تمنع الاستعمال العشوائي والمستمر لاي مضاد حيوي لما فيه مخاطر على الصحة العامة منها :

1- تلوين الاسنان وخاصة عند استعمال التتراسايكلين من قبل الاطفال .

2- فقدان السمع عند استعمال المضاد الحيوي الـ Streptomycine .

3- الاسهال عند بعض المرضى وخاصة عند استخدام الامبيسلين .

4- بعض المضادات الحيوية لها تاثير على الاجنة اذا استخدمت من قبل الحوامل بدون

فحص الحساسية للمضادات الحياتية Sensitivity test

يمكن الاستفادة من هذا الفحص للتعرف بصورة دقيقة على الفعالية القصوى لاي مضاد حيوي وتاثيره بصورة فعالة على نوع البكتريا المراد القضاء عليها وعادة يستخدم هذا الفحص في المستشفيات والمختبرات الطبية في بعض الحالات المرضية مثل التهاب المجاري البولية المزمن والتهاب اللوزتين والتهاب الجروح والالتهابات الاخرى .

المواد اللازمة

1- مزرعة بكتيرية سائلة عمرها 18-24 ساعة Broth Culture .

2- اطباق بتري حاوية على وسط الاكار المغذي Nutrient Agar .

3- اقراص للمضادات الحياتية (مختلفة) .

4- مسحات قطنية معقمة Cotton swab .

5- ماصات معقمة .

6- ملقط .

7- مصباح بنزن .

8- كحول 70% للتعقيم .

طريقة العمل

1- يتم تعقيم مكان العمل بالكحول 70% .

2- ينقل 0.1 مل من مزرعة البكتريا السائلة المتوفرة الى سطح الاكار المغذي بعد فتح الطبق بالقرب من مصباح بنزن .

3- ينشر البكتريا باستخدام Cotton swab بصورة جيدة وبجميع الاتجاهات لضمان توزيع البكتريا بصورة متساوية ودقيقة على جميع سطح الطبق .

4- يترك الطبق مدة 20-30 دقيقة لضمان تشرب المزروع السائل داخل وسط الاكار المغذي .

5- يعقم الملقط بالتلهيب الكحولي ويتم توزيع اقراص المضادات الحياتية بصورة متساوية المسافة بين كل نوع من انواع المضادات الحياتية المستخدمة باستخدام الملقط مع مراعاة ان تتم العملية بالقرب من لهب مصباح بنزن .

6- تحضن الاطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة بعدها تتم قراءة النتائج .

ملاحظة : اذا كانت المزرعة صلبة فيتم عمل معلق بكتيري وذلك باخذ كمية من المحلول الملحي الفسلجي المعقم او الماء المقطر المعقم في انبوب نظيف ومعقم ويتم نقل بكتريا باستخدام الناقل البكتيري اللوب ويمزج جيدا وبهدوء ويتم اخذ 0.1 منه الى وسط الاكار المغذي

نقل 0.1 مل من البكتريا السائلة

نشر البكتريا على سطح الاكار

توزيع اقراص المضادات الحياتية

تثبيت الاقراص على سطح الاكار

بعدها تحضن الاطباق بدرجة 37م لمدة 18 -24 ساعة

قراءة النتيجة بقياس منطقة التثبيط

ملاحظة : اذا كانت الزرعة السائلة ذات نمو كثيف حيث يمكن ملاحظة العكارة الشديدة في هذه الحالة يجب اجراء تخفيف المزرعة باستخدام الماء المقطر المعقم او المحلول الملحي الفسلجي المعقم وذلك بعمل عدة تخافيف حسب كثافة النمو ويتم اخذ التخفيف الاخير لعمل فحص الحساسية .

قراءة النتائج

تتمثل النتيجة بتكوين حلقة عدم نمو حول قرص المضاد الحيوي ذو التاثير القاتل للبكتريا تسمى منطقة التثبط البكتيري Inhibition Zone وهي المنطقة الخالية من النمو هذا يشير الى ان المضاد المستخدم ذو فعالية قاتلة للبكتريا يتم قياس هذه الحلقة (IZ) منقطة التثبيط باستخدام مسطرة شفافة وذلك بقياس القطر كاملا واعطاء النتيجة بالملمتر . مع مقارنته ببقية الاقراص المستخدمة عدم ظهور هذه الحلقة الرائقة دليل الى عدم فعالية المضاد الحيوي . كما ان زيادة قطر الحلقة او نقصانه يعتمد على قوة فعالية المضاد الحيوي فكلما اتسعت منطقة التثبيط زادت فعالية المضاد الحيوي والعكس صحيح ويتم عمل مقارنة بين المضادات الحياتية المستخدمة لسهولة دراستها .

قياس قطر دائرة التثبيط بالمليمتر

اختبار فعل المواد الكيمياوية المانعة او القاتلة للمكروبات

هناك الكثير من المواد الكيمياوية عضوية ام غير عضوية سامة للاحياء المجهرية ويستخدمها المرضية او الفساد الميكروبي للاغذية او المواد الاخرى وان فعل هذه المواد اما ان توقف نمو وفعالية الخلايا الميكروبية او انها مميتة تقتل الخلايا .

وتسمى المواد الكيمياوية المانعة للنمو Microbiostatic اما المواد المميتة او القاتلة تسمى Microbicides ويوضح التمرين الاتي كيفية المقارنة بين فعل المواد المانعة والقاتلة المتعددة .

خطوات العمل

1- تحضر اربعة اطباق بتري تحوي وسط الاكار المغذي .

2- يزرع اثنان منها ببكتريا *E.coli* والاخران ببكتريا *Bacillus. subtilis* .

3- تحضر قطع دائرية صغيرة من اقراص ورق الترشيح متساوية في الحجم ويغمر نصف عددها في احد المواد الكيمياوية المانعة للنمو ويغمر النصف الاخر في مادة كيمياوية قاتلة .

4- تؤخذ قرصين من الاقراص المحتوي على المادة المانعة للنمو وتوضع احدهما في طبق بكتريا *E. coli* اما الاخر فتوضع في طبق *B. subtils* وبنفس الطريقة تؤخذ قرصين ايضا من الاقراص المحتوية على المادة القاتلة وتوضع احدهما في طبق *E. coli* والثاني في طبق *B. subtilis* .

5- تحضن الاطباق في درجة 37م ولمدة 24- 48 ساعة .

6- تفحص الاطباق جميعا وتلاحظ المناطق الخالية من النمو حول الاقراص لورق الترشيح . يقاس قطر المنطقة الخالية من النمو وتسجل النتائج كما في الجدول .

تشخيص العزلات الجرثومية

ويتم التشخيص باستخدام الطرق التقليدية للعزل رغم انه لا يمكن الحصول على نتائج قاطعة حيث ادى هذا الاختلاف والنقص في الدقة الى ابتكار واستخدام الوسائل الحديثة كالتعرف على RNA ومقارنة الشفرة الوراثية لـ DNA واستخدام البروتينات للتعرف على الاختلاف بين الانواع وكذلك استخدمت الطرق الفيزياوية في التفريق بين الانواع البكتيرية مثل اجهزة المطياف الضوئي وكذلك استخدمت الاجسام المضادة كفحص الـ EILSA .

الاختبارات التقليدية

يتم الحصول على مزرعة نقية بالاختبارات الاتية :

1- ملاحظة الشكل المظهري (الظاهري) للبكتريا (عنقودية سبحية عصوية ...الخ) بالاضافة الى تفاعلها مع بعض الصبغات مثل صبغة كرام G^- , G^+ .

2- اختبار الحركة كاستخدام القطرة المعلقة او بواسطة تنمية البكتريا على بعض الاوساط الصلبة .

3- ملاحظة وجود او عدم وجود Endospore .

4- ملاحظة النمو بوجود الاوكسجين او عدمه .

الاختبارات الكيميائية الحيوية Biochemical tests

تستخدم للتفريق بين الاجناس والانواع من هذه الاختبارات

1- اختبار فعالية انزيم اليوريز Urease test وتتم بتلقيح موائل وسط Christensen's urea اكار اليوريا بعزلات نقية من الجراثيم وتحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ويتم التعرف على النتيجة الموجبة للاختبار من خلال تغير لون الوسط من الاصفر الى الاحمر دلالة على قدرة الجراثيم على انتاج اليوريز وتحليل اليوريا وانتاج الامونيا *Proteus sp* .

+ Ve احمر

-Ve اصفر

$$Co(NH_3)_2 + 2H_2O \xrightarrow[\text{انزيم}]{\text{Ureas}} Co_2 + H_2O + 2NH_3$$

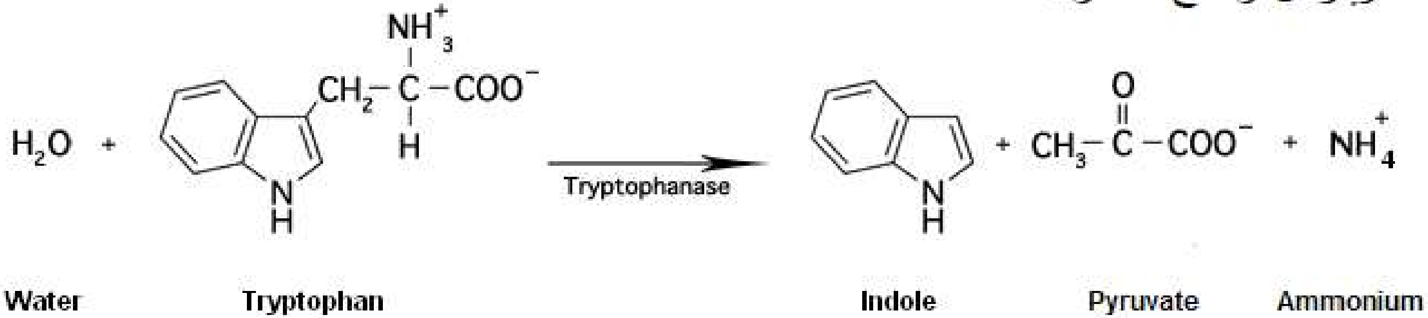
ا اختبار اليوريز

2- مجموعة اختبارات IMViC

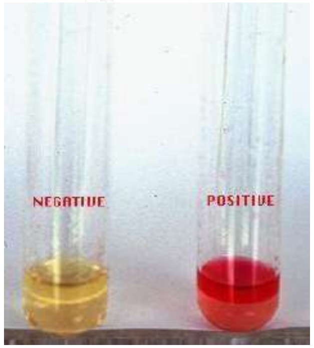
وهي تتضمن اربعة اختبارات

أ- اختبار الاندول Indol test

حيث يضاف قطرات من كاشف كوفاكس Kovac's –reagent الى الجراثيم المزروعة على وسط ماء الببتون والمحضنة بدرجة 37C م° ولمدة 24 ساعة . ظهور الحلقة الحمراء في الطبقة العليا للوسط +Ve النتيجة موجبة ويدل هذا على قدرة البكتريا على تحليل الحامض الاميني التربتوفان وانتاج الاندول *E. coli* .

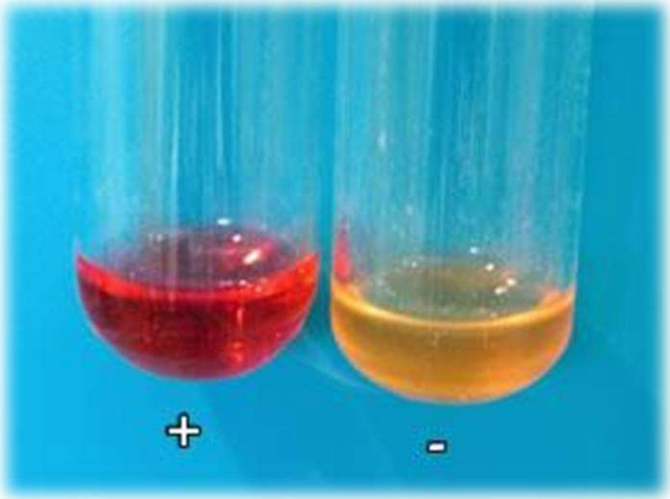


اختبار الاندول



ب- اختبار المثيل الاحمر Methyl Red test

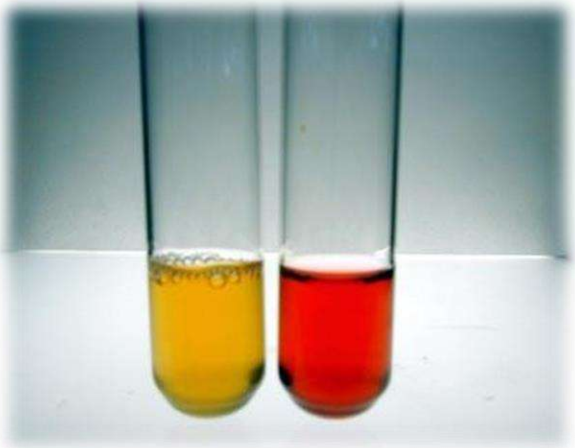
من خلاله يتم معرفة النوع البكتري المنمى على وسط كلوكوز ببتون بفرد فوسفات glucose phosphate – buffered– peptone يكشف الاختبار عن قدرة البكتريا على انتاج كمية كافية من الحامض العضوي وتخمير سكر الكلوكوز وبالتالي سوف تنخفض حموضة الوسط الغذائي تصل الى 4 وبذلك سيتغير لون الكاشف من الاصفر الى الاحمر يمكن من خلال هذا الفحص التفريق بين *E. coli* الموجبة لهذا الفحص والـ *Klebsiella* السالبة للفحص .



اختبار المثيل الاحمر

جـ- فحص Voges proskauer الفوكس بروسكور

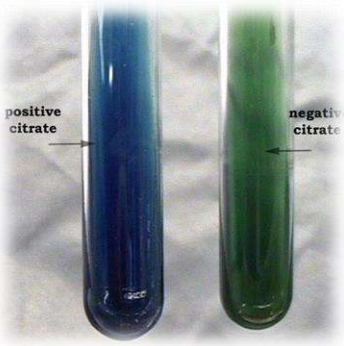
يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة بعض المايكروبات على تخليق مركب متعادل يسمى Carbonile (Acetoin) Acetyl methyl من تكسير الكلوكوز الموجود في الوسط كلوكوز ببتون بفرد فوسفات phosphate – peptone-buffered glucose حيث ينتج حامض البيروفيك الذي يتحول الى Acetoin ويستخدم كاشف باريت Baritt وتكون النتيجة الموجبة بتغيير لون الوسط الاصفر الى اللون الاحمر اما النتيجة السالبة بقاء الوسط اصفر وهو لون الوسط الطبيعي وتعد *Enterobacter aerogenes* موجبة للفحص .



اختبار الفوكس بروسكور

د– فحص استهلاك السترات Citrate Utilization test

يستخدم للكشف عن البكتريا التي لها القدرة على استخدام السترات كمصدر للكاربون الوسط المستخدم Simmons Citrate agar ويكون لونه اخضر حيث يتحول الى اللون الازرق في حالة النتيجة الموجبة وتكون الـ *Enterobacter aerogees* موجبة للفحص .



اختبار استهلاك السترات

3– فحص اسالة الجيلاتين Gelatin liquefaction

يستخدم لمعرفة قدرة المايكروبات على تحويل الجيلاتين من الحالة الصلبة الى الحالة السائلة وذلك بانتاجها انزيم الـ Gelatinase من قبل البكتريا .

اختبار اسالة الجلاتين

4- فحص Oxidase (الكشف عن انزيم Cytochrome oxidase)

يستخدم للكشف عن قدرة البكتريا على افراز انزيم Cytochrome oxidase حيث يتم قياس قدرة البكتريا على اكسدة بعض المركبات العطرية مثل Amine dimethyl aniline بواسطة انزيم Oxidase ويتم باستخدام قرص Oxidase الذي يعمل كمانح للالكترونات . اذا اكسدة البكتريا القرص سيدوا ارجواني اللون تكون البكتريا التالية موجبة للفحص

Vibrio sp , Neisseria sp Pseudomonas sp

يتم وضع المحلول الخاص بالاختيار Tetra methyl – para –phenylene – diaminehydrochlorid على ورقة ترشيح موضوعة داخل طبق بتري وبواسطة لوب معقم بنقل جزء من المستعمرة البكتيرية وتمسح على سطح الورق المبلل بالمحلول ويلاحظ ظهور اللون البنفسجي .

اختبار Oxidase

5- فحص Catalase

يستخدم هذا الفحص للتعرف على قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكتاليز Catalase الذي يعمل على تحرير ذرة اوكسجين عند تفاعله مع بيروكسيد الهيدروجين

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + O_2$$

طريقة اجراء الفحص : ناخذ شريحة نظيفة ونضع عليها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين ، ثم نعقم اللوب وناخذ جزء من المستعمرة البكتيرية على قطرة بيروكسيد الهيدروجين ونلاحظ ظهور فقاعات غازية وتعد بكتريا *Staphylococcus sp* موجبة للفحص .

اختبار Catalase

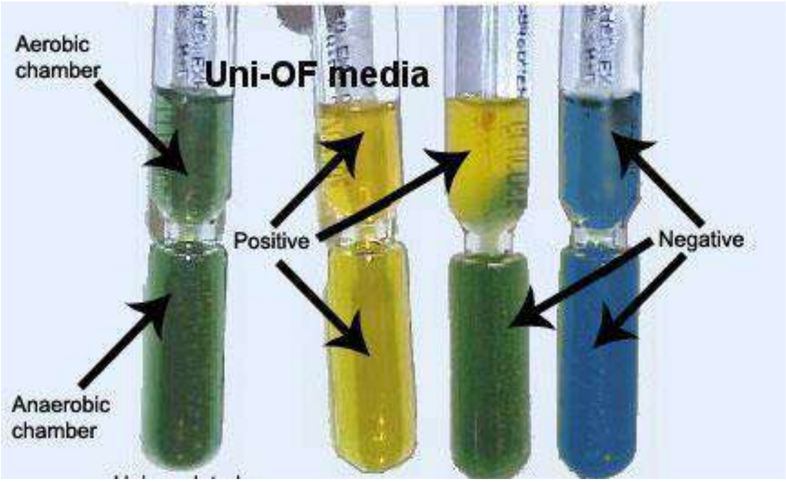
6- اختبار التخمر والاكسدة (O-F test) Oxidation –Fermentation test

ويتم التعرف على تعامل نوع بكتيري مع مادة كاربوهيدارتية وعادة تكون الكلوكوز ان كان النوع البكتيري يستخدم السكر تنفسيا واكسدة ، او يخمره وذلك باستخدام انبوبات حاوية على وسط غذائي شبه صلب يحوي السكر ودليل لوني تلقح الانابيب السابقة بعد تسخين احدهما لطرد الاوكسجين وتغطى الانبوبة بالزيت المعقم تحضن لفترة 1–4 يوما لتغير اللون اخضر باهت .

Salmonella +Ve

Proteus - Ve

اختبار التخمر والاكسدة



7- التشخيص بنظام API 20E

يعتبر من الاختبارات التشخيصية المنظورة حيث يمكن اجراء عدد من الاختبارات في نفس الفترة الزمنية كما يعتبر من الاختبارات ذات النتائج الدقيقة جدا يتكون الاختبار من شريط يحتوي على عدد من الحجرات وكل حجرة تمثل اختبار تشخيص معين ويجرى في ان واحد .

شريط API