المحاضرة رقم (1)

ضوابط السلامة في مختبرات الاحياء المجهرية

1- استخدام صدرية المختبر لمنع تلوث الملابس بالاحياء المجهرية والاصباغ
2- يمنع الاكل او الشرب للوقاية من نقل العدوى
3- عدم لمس العيون او الفم او الانف للوقاية من نقل العدوى
4- مسح المنضدة المستخدمة في العمل بين وقت واخر بالمطهرات لمنع نقل الاحياء المجهرية ويجب ان تكون المنضدة خالية من الادوات الشخصية والكتب
5- عدم سكب الاوساط الغذائية النامية فيها البكتريا في المغسلة
6- لا تنقل المزارع البكتيرية من اي نوع كانت الى خارج المختبر
7- التأكد من غلق صنابير الغاز وصنابير الماء قبل مغادرة المختبر
8- غسل الايدي بالماء والصابون وتطهر بأحد المطهرات قبل مغادرة المختبر لمنع نقل الاحياء المجهرية الى خارج المختبر .

اهم الاجهزة المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية

1- فرن الهواء الحار Hot – air Oven

ويستخدم لتعقيم المواد التي تتحمل درجات الحرارة العالية كالزجاجيات (صحون بتري والدوارق والماصات وغيرها) والادوات المعدنية (الملاقط والمقاص والسكاكين وغيرها) حيث تتعرض تلك المواد لدرجة حرارة تتراوح بين (160° c – 180°c) ولفترة 2-3 ساعات . ولا يستخدم لتعقيم الاوساط الزرعية لانها تتلف بسبب الحرارة العالية، وكذلك لا يعقم القطن والمواد المصنوعة من الورق بهذه الطريقة لانها تحترق وتتفحم بسبب الحرارة العالية .

2- المؤصدة Autoclave

يستخدم لتعقيم الاوساط الزرعية الجديدة واتلاف الاوساط الزرعية المزروعة بالبكتريا قبل التخلص منها، وكذلك لتعقيم المواد الكيمياوية التي لا تتلف بالحرارة العالية . اساس عمله هو استخدام بخار الماء المضغوط steam under pressure ، فعند تسخين الماء في حيز مغلق وعندما يصل الى 15 باوند/انج^2 او 1.5 بار فأن درجة حرارة البخار تصل الى 121م° ، وهي درجة حرارة عالية تكفي لقتل جميع الاحياء المجهرية ومن ضمنها الاحياء المجهرية المكونة للسبورات Spore-forming microorganism وبفترة زمنية 15 دقيقة ويزداد الوقت في حالة الاتلاف الى 20 دقيقة.

3- الحاضنة Incubater

وتستخدم لحضن الاوساط الزرعية الملقحة بالاحياء المجهرية حيث توفر درجة حرارة مناسبة لنمو الاحياء المجهرية كلاً حسب نوعه ، حيث ان لكل نوع منها مدى من درجات الحرارة الملائمة لنموه ، بالنسبة للبكتريا فأن الدرجة الحرارية المثلى للنمو 37م°.

4- غرفة التلقيح Hood

ويتم داخلها تلقيح الاوساط الزرعية بالاحياء المجهرية حيث تحتوي على مفرغات هواء لمنع استنشاق الاحياء المجهرية وخاصة الممرضة للجهاز التنفسي وتكون عادة معقمة ودرجة التلوث فيها بأقل حدودها وبذلك نضمن سلامة الفحوصات المختبرية من التلوث.

5- حمام مائي Water bath

ويستخدم في بعض التجارب الخاصة لتوفير درجة حرارة معينة حسب التجربة .

6- ميزان حساس Sensitive balance

يستخدم للحصول على وزن دقيق جداً عند تحضير الاوساط الزرعية وجميع المواد الكيمياوية المستعملة في التجارب المختبرية .

7- الخلاط الكهربائي Blender

ويستعمل للحصول على محلول متجانس من العينة قيد الدراسة وخاصة في عينات الاغذية .

8- جهاز الطرد المركزي Centrifuge

ويستخدم لترسيب المواد وفصلها عن الراشح ، ويعتمد الفصل على سرعة الدوران في الدقيقة Round per minute (RPM) حيث يثبت الجهاز على سرعة معينة في زمن معين حسب التجربة .

9-المجهر Microscope

ويستخدم لرؤية الاحياء المجهرية التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة ويستعمل المجهر الضوئي المركب للدراسة في مختبرات البكتريا فيمكننا من فحص التحضيرات المصبوغة للبكتريا ودراسة صفاتها المورفولوجية ودراسة حركتها ، وسمي بالمركب لانه يحتوي على مجموعتين من العدسات (العينية والشيئية) تعمل معاً لتكبير الصورة وقوة تكبير المجهر تحسب من حاصل ضرب قوتا تكبير العدستين المستعملتين

10- المازج Vortex

لمزج او خلط العينات السائلة او المحاليل للحصول على محلول متجانس .

11-مقياس الاس الهيدروجيني pH-meter

لقراءة الاس الهيدروجيني للمحاليل والسوائل والاوساط الزرعية .

12-مقياس ضوئي طيفي Sepectrophotometer

ويستخدم لقياس الكثافة الضوئية لعالق الاحياء المجهرية لتحديد كتلة او عدد الخلايا في العالق .

شكل يوضح بعض الاجهزة المستخدمة في مختبر الاحياء المجهرية

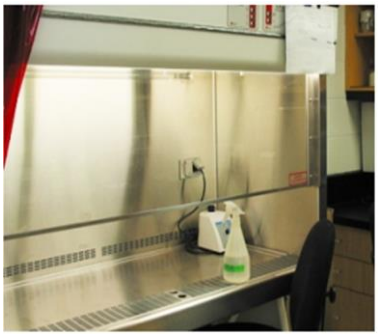
Incubater

Autoclave

Hot – air Oven

Sensitive balance

Water bath



Hood

Microscope

Centrifuge

Blender

Spectrophotometer

pH-meter

Vortex

اهم الادوات المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية

أ- ادوات زجاجية مختلفة تشمل :

1-ماصات لنقل المحاليل **Pipettes**

2-اطباق بتري **Petri dishes**

3-انابيب اختبار **Test tube**

4-شرائح زجاجية **glass slides**

5-دوارق حجمية **Volumetric flasks**

6- دوارق عادية **Beakers or flask**

7- اسطوانات حجمية **Volumetric cylindrical**

8-مقياس حرارة **Thermometer**

9-علب زجاجية مع غطائها **Screw cap**

ب- ادوات معدنية تشمل :

1-ناقل معدني **Loop**

2-ابر تلقيح **Needles**

3-ملاقط **Forceps**

4- سكاكين **Knifes**

5-ملاعق **Spoons**

*بالاضافة الى الماسحات القطنية **Cotton swabs** ومصابيح بنزن **Bunsen burners** .

المواد المستخدمة في مختبرات الاحياء المجهرية

1-اوساط زرعية صلبة وسائلة **Culture media**

2-اقراص المضادات الحيوية **Antibiotics disc**

3- مطهرات ومعقمات **Antiseptic & Disinfectant**

4- مواد كيمياوية **Chemical agent**

5- مواد طبيعية كالدم **Blood** والمصل **Serum** والحليب **Milk** والانزيمات **Enzymes**.....الخ

المحاضرة رقم (2)

التعقــــيم والتطـــهير Sterilization and Disinfection

تعريف التعقيم (Sterilization) : هي عملية القضاء على جميع الاحياء المجهرية الملوثة لمادة معينة وعلى هذا الاساس فقد تكون المادة معقمة Sterile او غير معقمة Non Sterile .

تعريف التطهير (Disinfection): هي عملية التخلص من الاحياء المجهرية المرضية الخضرية .اما **المطهرات** (**Disnfectants**) فتعرف على انها مواد كيميائية قاتلة للبكتريا وتستخدم في تطهير الاشياء كالمواد غير الحية مثل الادوات والارضيات .

طرق التعقيم Sterilization Methodes

ويتم التعقيم بصورة عامة بطريقتين رئيسيتين هما : الطرق الفيزياوية والطرق الكيمياوية .

اولا" : الطرق الفيزيائية Physical methods وتشمل كل من :

A- الحرارة Heat ويتضمن مايأتي : –

1- التعقيم بالحرارة الجافة Dry heat Sterilization وتشمل :

أ- **التلهيب حتى الاحمرار:** وتتم هذه العملية بواسطة تمرر الادوات المراد تعقيمها خلال اللهب مباشرة الى درجة الاحمرار ،وتستعمل بعد تبريدها كما في حالة تعقيم الناقل الجرثومي (loop) و نهايات الملاقط.

ب - **التلهيب لفترات قصيرة:** تمرر الادوات المراد تعقيمها للهب مباشرة لفترة قصيرة دون الوصول الى درجة الاحمرار ، كما في حالة تلهيب فتحات الانابيب والدوارق والماصات.

ج- **الفرن الكهربائي**: ويستخدم الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 160-180مْ لمدة ساعة واحدة ، كما في تعقيم الادوات الزجاجية والمعدنية .

2 – التعقيم بالحرارة الرطبة Moist heat Sterilization وتشمل :

أ- **البسترة Pasteurization:** سميت بالبسترة نسبة للعالم لويس باستور ، وتتم اما بأستعمال درجة حرارة 62,9مْ لمدة 30 دقيقة وتسمى بطريقة المسك Holding method، او بدرجة حرارة 71,6مْ لمدة 15 ثانية وتسمى بطريقة الوميض Flash method ، وتستخدم للقضاء على اغلب الجراثيم الممرضة مثل عصيات السل والسلمونيلا وبروسيلا ، لكنها لا تقضي على الابواغ.

2- الغليان Boilling : وتتم بالتسخين بدرجة حرارة 100مْ لمدة 5-10 دقائق ،كافية لقتل الجراثيم الخضرية وقسم من الجراثيم المكونة للابواغ . ولكن هنا المواد تتعرض للتآكل والصدأ ، فضلاً عن سرعة تلوثها لانها تكون غير مغلفة عند اخراجها من الغليان .

3- **التندلة Tyndalization:** سميت بالتندلة نسبة الى العالم تندال، ويتم التعقيم بأستخدام الحرارة المتقطعة لفترات زمنية طويلة . حيث تسخن المواد المراد تعقيمها بدرجة 100م ْبأستخدام الحمام المائي ولمدة 30 دقيقة ، ومن ثم تحضن هذه المواد بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة ، وتكرر هذه العملية لمدة 3 ايام متتالية . ان الغاية من هذه العملية هي السماح للابواغ بالتحول الى الحالة الخضرية عند حضنها وبالتالي قتلها في اليوم التالي . تستخدم هذه الطريقة لتعقيم المواد والمحاليل التي تتأثر بالحرارة العالية بأستخدام المؤصدة كما في حالة السكريات .

4- **التعقيم بالمؤصدة Autoclaving/** وتتم بأستخدام جهاز الاوتوكليف بدرجة حرارة 121م و15 باوند/انج^2 لمدة 15-30 دقيقة ، ويعتمد على مبدأ الحرارة الرطبة مع الضغط ، وتستخدم لتعقيم المواد التي تتلف بالحرارة الجافة كالاوساط الزرعية .

B- التعقيم بالترشيح Filtration

وتستعمل مرشحات غشائية خاصة ذات اقطار مختلفة لهذا الغرض ، وتستخدم لتعقيم المواد التي تتأثر بالحرارة مثل السموم (الذيفانات) والمصول والسكريات والمضادات الحيوية .

C -التعقيم بالاشعاع Radiation

ويتم بأستخدام نوعين من الاشعة حسب اطوالها الموجية :

أ - **الاشعة المؤينة Ionizing radiation**: وتضم كل من الاشعة السينية (X-Ray)

واشعة كاما (Gamma Ray) .

ب- الاشعة فوق البنفسجية U.V light .

ثانيا" : التعقيم بالطرق الكيميائية Chemical methods

يكون تأثير العوامل الكيميائية Chemical agents اما قاتلاً للبكتريا **Bactreicidal** او مثبطاً لنمو البكتريا **Bacteriostatic** . وتشمل العوامل الكيميائية ما يأتي :

1- الكحولات Alcohols

ان للكحول الاثيلي والكحول الايزوبروبيلي تأثير فعال في قتل البكتريا ، اذ تكون الية عملها هي تغيير طبيعة البروتين داخل الخلية ، واذابة المواد الدهنية في الغشاء الخلوي للبكتريا .

* ان الكحول بتركيز 70% يكون ذو فعالية كبيرة مقارنة بالتركيز 99.99% ، وذلك لان أضافة الماء الى الكحول يزيد من فعاليته.

2- الفينولات Phenols

تعمل الفينولات على تحطيم الاغشية السايتوبلازمية للبكتريا مما يؤدي الى تسرب محتويات الخلية الى الخارج في التراكيز الواطئة وتسبب تخثر البروتين في التراكيز العالية موتها.

3- المعادن الثقيلة Heavy metals

المعادن الثقيلة مثل الزئبق والفضة ، تعمل على تثبيط تخليق البروتين وبالتالي موت الخلية الجرثومية.

4- **الصوابين والمنظفات** Soap & detergents

مثل مركبات الامونيوم الرباعية ،تعمل على مهاجمة الغشاء الخلوي للبكتريا واذابة الشحوم .

5- العوامل الغازية Gaseous agents

مثل الفورماليهايد واوكسيد الاثيلين ، تعمل على تحطيم المادة النووية .

المحاضرة رقم (3)

الاوساط الزرعية Culture media

الوسط الزرعي :هو عبارة عن المادة الغذائية الملائمة لنمو الكائن المجهري في المختبر بطريقة تساعد الباحث في عزل البكتريا بصورة نقية ومن ثم تكثيرها ، كما تساعد على وصف المستعمرات النامية وكذلك تحضير البكتريا بكميات كبيرة لغرض استعمالها في تحضير المضادات الحيوية واللقاحات .

المكونات الاساسية للاوساط الزرعية :- تشترك معظم الاوساط الزرعية في احتواءها على المواد التالية :

1- البيتون Peptone : يعتبر مصدراً هاماً للنتروجين العضوي في البيئات المعدة لتنمية البكتريا غير ذاتية التغذية ، يحضر من اللحم الخالي من الدهون بعد تحلله بأنزيم الببسين .

2- خلاصة اللحم Beef extract: تحضر من اللحم البقري الخالي من الدهون بعد غليه وترشيح الخلاصة وتركيزها ، يحتوي المستخلص على بعض الاحماض العضوية وبعض المواد اللاعضوية مثل الاحماض الامينية ، الكلوكوز ، اليوريا ، حامض اللكتيك ، الفيتامينات وعوامل نمو اخرى .

3- **خلاصة الخميرة Yeast extract :** تحتوي على بعض الاحماض الامينية ، وبعض العوامل المساعدة للنمو ، واملاح معدنية .

4- الماء Water : تحتاج الخلايا الحية الى الماء لنموها ولااتمام عملياتها الايضية ، وعلاوة على استخدامه كمادة مذيبة للمواد الغذائية . ويفضل استخدام الماء المقطر لخلوه من الاملاح المعدنية .

5- **المواد التصليبية Solidifying agents:** تضاف الى بيئة الزرع السائلة بعض المواد لتساعدها على تحولها الى بيئة صلبة تساعد على تكوين مستعمرات فردية ومنها :

أ- **الجيلاتين Gelatin**/ هو عبارة عن مادة بروتينية تحضر بمعاملة عظام الحيوانات . يندر استعمالها حالياً كمادة تصلبية في البيئة ، نظراً لان الكثير من البكتريا يمكنها تحليله مائياً ، ولانه ينصهر عند درجات التحضين .

ب/ **الآكار آجار Agar agar :** مادة كربوهيدراتية تستخلص من بعض الطحالب البحرية الحمراء والتي تنمو بوفرة على سواحل بعض الدول مثل اليابان . يتصلب عند درجة حرارة من 42-45مْ ، ويمكن اسالته مرة ثانية عند درجة حرارة 98مْ، ويتميز عن الجيلاتين كونه لايمكن تحليله بيولوجياً لان عدد الكائنات المحلله له قليل جداً.

ج/ **السليكا Silica:** تعتبر مادة غير غذائية فهي تستعمل في تحضير البيئات اللازمة لتنمية الكائنات الذاتية التغذية ، وذلك لمنع نمو البكتريا غير ذاتية التغذية معها .

تقسيم الاوساط الزرعية

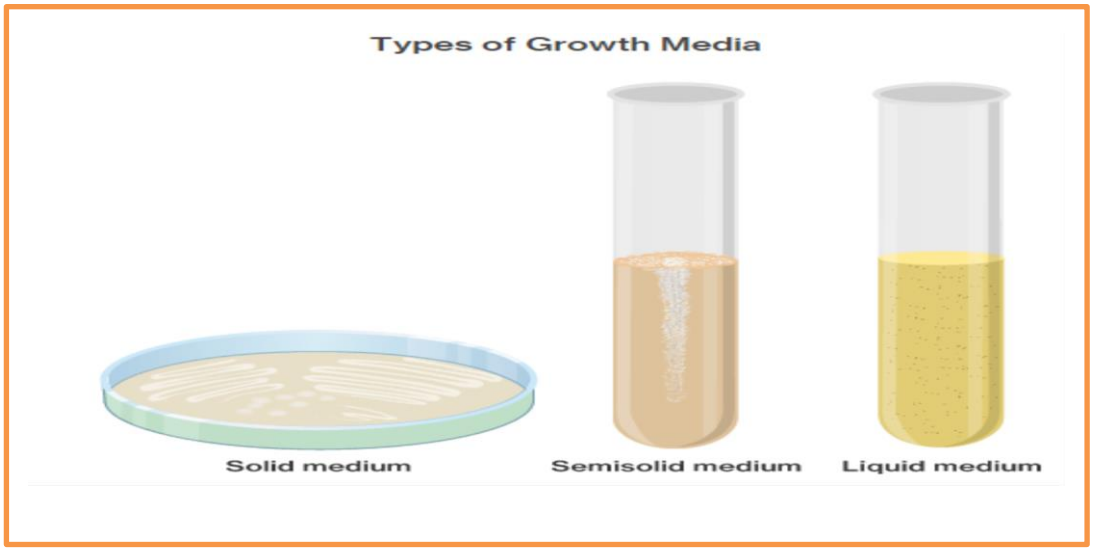
تقسم الاوساط الزرعية حسب :

اولاً/ حسب الطبيعة الفيزياوية الى :

1- **الاوساط الصلبة Soild media** : تتميز بكونها صلبة القوام نتيجة لاضافة مادة الاكار الى الوسط الزرعي

2- **الاوساط السائلة Liquid media** :فتكون سائلة القوام وتسمى بالمرق المغذي.

3- **الاوساط شبه الصلب Semi- soild media** : تكون الاوساط شبه الصلبة ذات قوام جيلاتيني.

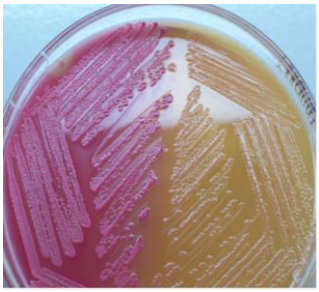


ثانيا / تقسم حسب الغرض من استخدامها الى :

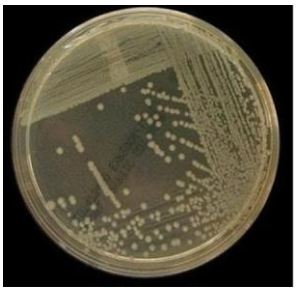
1- **الاوساط البسيطة Simple media** : تحتوي على ابسط ما يمكن من المكونات الغذائية الاساسية التي تحتاجها البكتريا بحيث تمكنها من الحصول على الكربون والعناصر الاساسية للنمو والبقاء . تنمو فيها معظم انواع البكتريا والتي لا تحتاج الى مواد معقدة لنموها . مثل المرق المغذي والاكار المغذي وماء الببتون.

2- **الاوساط التفريقية Differential media** : وتستعمل للتفريق والتمييز ما بين انواع البكتريا المختلفة ، مثل وسط الماكونكي يحتوي هذا الوسط على سكر اللاكتوز والذي يستخدم بين اجناس البكتريا المخمرة واللامخمرة لسكر اللاكتوز .فالمخمرة تظهر بلون وردي اما غير المخمرة فتكون بلون اصفر شاحب. ووسط اكار الدم الذي يستخدم للتمييز بين البكتريا المحللة للدم والبكتريا غير المحللة .

Blood agar



MacConkey agar



Nutrient agar

3- **الاوساط الانتخابية Selective media** : تحوي هذه الاوساط على مواد مثبتطة لنمو البكتريا الغير المرغوب فيها وفي نفس الوقت تعزز البكتريا المراد عزلها .مثالها:

A - وسط السالمونيلا والشيكلا Salmonella Shigella agar

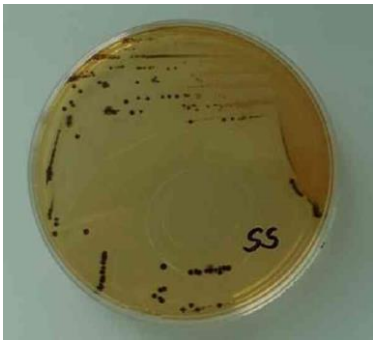
يستعمل هذا الوسط لغرض تنمية بكتريا العصيات المعوية السالمونيلا والشيكلا ويمنع نمو كافة الاجناس البكتيرية الاخرى غير المرغوب فيها ، يتميز بأحتوائه على املاح الصفراء كمواد مثبطة ، كما يحتوي على مادة الثايوسلفايت التي تساعد البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين بحيث تظهر المستعمرات المنتجة لهذا الغاز ذات مركز اسود.

B - وسط سكر المانيتول والملح Mannitol salt agar

يستعمل لعزل بكتريا المكورات العنقودية ، يحتوي على تركيز عالي من ملح الطعام كمادة مثبطة ، كما يتميز بأحتوائه على سكر المانيتول الذي يستعمل للتمييزبين البكتريا المخمرة لهذا السكر والتي تظهر صفراء اللون عن البكتريا غير المخمرة له والتي تظهر حمراء اللون .

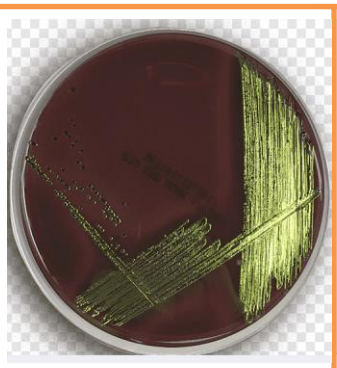
C - وسط الايوسين المثيلين الازرق Eosine Methylene Blue(EMB)

يتميز هذا الوسط بأحتوائه على مادة الايوسين والمثيلين الازرق ، ويستعمل لعزل وتشخيص بكتريا القولون ذات بريق معدني اخضر .



SS agar

Mannitol salt agar


EMB

4- الاوساط الاغنائية Enriched media

هي اوساط بسيطة مضاف اليها مواد غنية بالمواد العضوية والفيتامينات والاملاح لغرض الحصول على نمو افضل لبعض البكتريا وذلك لحاجتها لهذه المواد لكي تنمو . مثل اكار الدم ،اكار الشوكلاته ، اكار نقيع القلب والدماغ ، اكار المصل واكار مح البيض

5- الاوساط الحية Living media

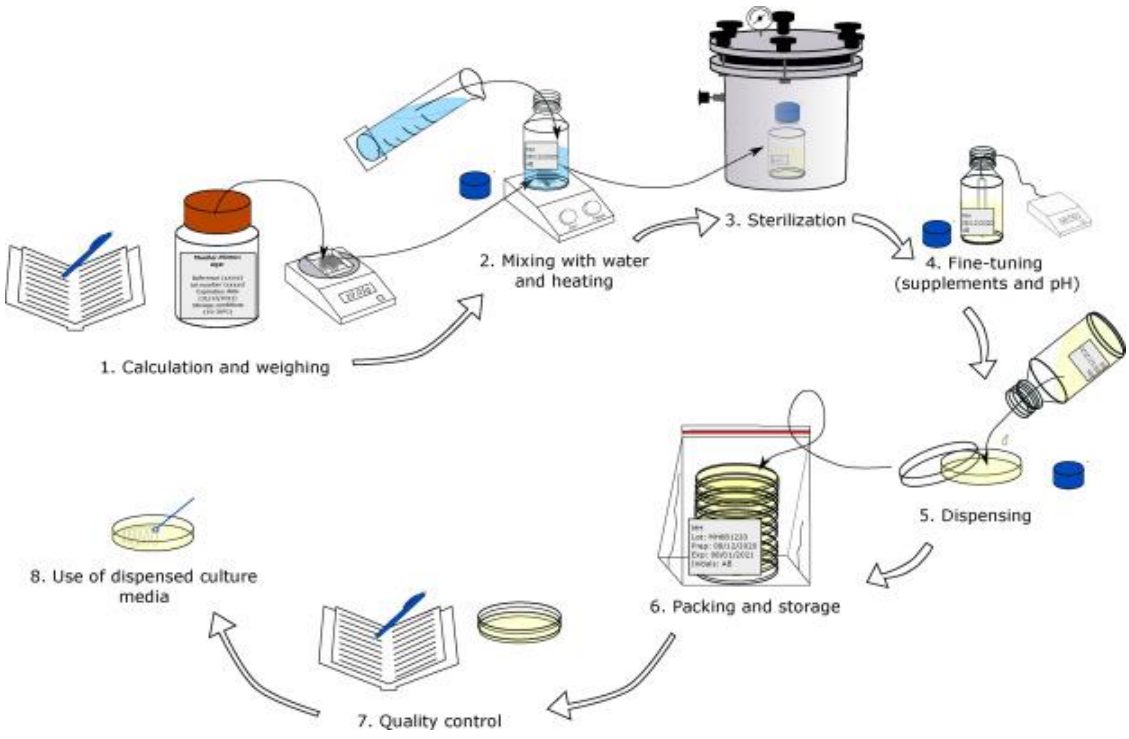
تتكون هذه الاوساط من خلايا او انسجة حيوانية او نباتية حية في وسط غذائي مناسب ، وتعتبر الفايروسات والركتسيا من الكائنات المجهرية التي تنمو اجبارياً على هذه الاوساط.

6- الاوساط الحافظة Maintenanse media : تستعمل للمحافظة على حيوية البكتريا وخواصها الفسلجية لفترة زمنية معينة ، اذ تكون هذه الاوساط غير مشجعة لنمو البكتريا ، وذلك لان النمو السريع يصاحبه الموت السريع للخلايا وهذا غير مرغوب في الوسط الحافظ ، لذلك يفضل عدم استخدام الكلوكوز في مثل هذه الاوساط ، مثال الاكار المغذي والمرق المغذي .

المحاضرة رقم (4)

خطوات تحضير الوسط الزرعي

1- نزن الكمية المطلوبة من الوسط الزرعي ،وحسب تعليمات الشركة المصنعة .
2- نذيب الوسط بكمية قليلة من الماء المقطر ، ومن ثم يكمل الحجم الى لتر .
3- يمزج الوسط جيدا بواسطة الجهاز المازج .
4- يعقم الوسط المحضر بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة وفي درجة حرارة 121مْ وضغط 15 باوند/ انج^2
5- يبرد الوسط بعد تعقيمه الى درجة حرارة 45 مْ
6- يصب الوسط الزرعي في اطباق بتري داخل الهود.
7- يترك الاكار ليتصلب .
8- تحفظ الاطباق في الثلاجة لحين الاستعمال وبشكل مقلوب .



خطوات تحضير الوسط الزرعي

المحاضرة رقم (5)

طرق تشخيص الاحياء المجهرية

A- طرق التشخيص الزرعية : وتعني التشخيص المظهري للبكتريا على الوسط الزرعي .

اولاً: زراعة الاحياء المجهرية في الاوساط السائلة

يستخدم وسط المرق المغذي ووسط نقيع القلب والدماغ بعد الصب في انابيب اختبار خاصة لهذا الغرض ، ويكون النمو في الوسط السائل على احد الاشكال التالية :

1- **عكورة Turbidity :** يظهر الوسط بشكل متعكر وليس رائقاً كما كان في البداية قبل عملية الزرع مثل بكتريا *E.coli* .

2- **نمو سطحي Pellicle growth :** ويكون النمو على شكل طبقة غشائية رقيقة تطفو فوق سطح السائل ، مثالها عصيات الـ *Bacillus* .

3- **تكوين راسب Sediment formation:** ويكون النمو بشكل راسب من الخلايا يستقر في قعر الانبوبة ، ونلاحظ عند رج الانبوبة بهدوء فأنه سوف يرتفع بشكل حلزوني للاعلى ، مثل بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* .

4- **تكوين مخاط Slime :** اذا استقر الراسب بالاسفل فهذا يعني ان الراسب مخاطي مثل *Klebsilla* .

5- **انتاج غاز Gas production :** ويضهر النمو بشكل فقاعات غازية تلاحظ عند رج الانبوبة مثل *E.coli* .

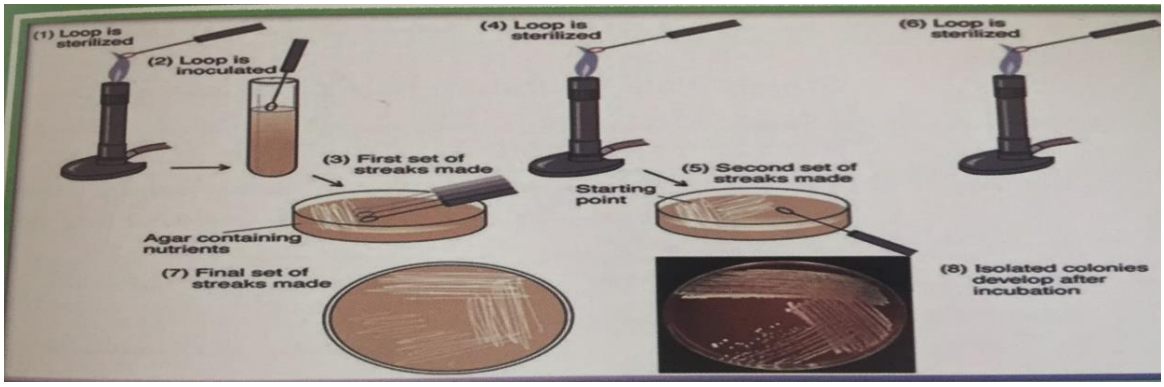
6- **انتاج الصبغات الخارجية Exopigmentation :** وهذا يؤدي الى تغير لون الوسط الزرعي كما في بكتريا الزوائف *Pseudomonas* .

ثانياً / زراعة الاحياء المجهرية في الاوساط الصلبة :

تمكننا هذه المزارع من الحصول على مستعمرات نقية ومنفردة تساعدنا في التشخيص ، ومن الطرق المستخدمة في زراعة البكتريا في الوسط الصلب:

1- طريقة تخطيط الطبق Streak –plate method

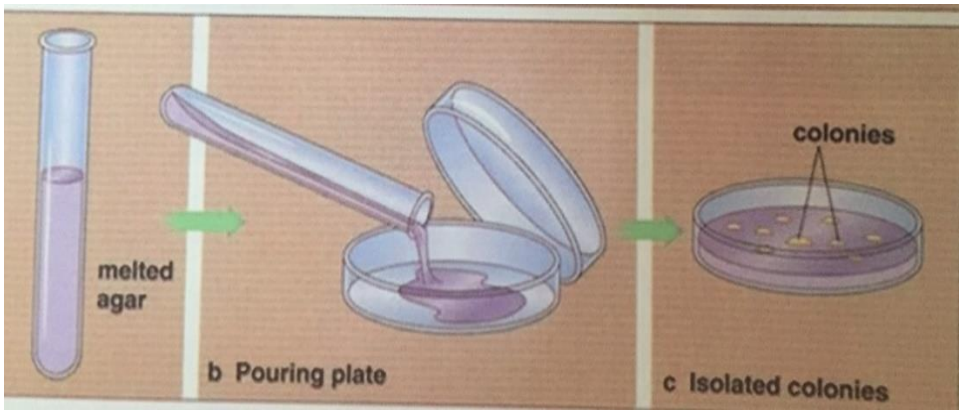
ويتم بأخذ جزء من المستعمرة البكتيرية المراد زرعها بواسطة الناقل الحلقي (loop) ، بعد تسخينه حد الاحمرار وتبريده في حافة الطبق . حيث توضع العينة المأخوذة بواسطة الناقل في طرف الوسط الزرعي بداخل اطباق بتري ومن ثم نبدأ بعملية التخطيط ، ومع الاستمرار بعملية التخطيط فأن ذلك يؤدي الى الحصول على مستعمرات منفردة ونقية .



2- طريقة الصب في الطبق Pour- plate method

وفي هذه يتم حقن البكتريا داخل الوسط الزرعي المحضر داخل الدورق وذلك اثناء تبريده ولكن قبل تصلبه ، وتمزج جيدا مع الوسط الزرعي وبذلك يساعد على نشر البكتريا في جميع اجزاء الوسط الزرعي .

هذه الطريقة مفيدة للحصول على مستعمرات نقية مما يساعد في تعداد البكتريا وكذلك لدراسة بعض الصفات البكتيرية مثل قابليتها على تحليل كريات الدم الحمراء .

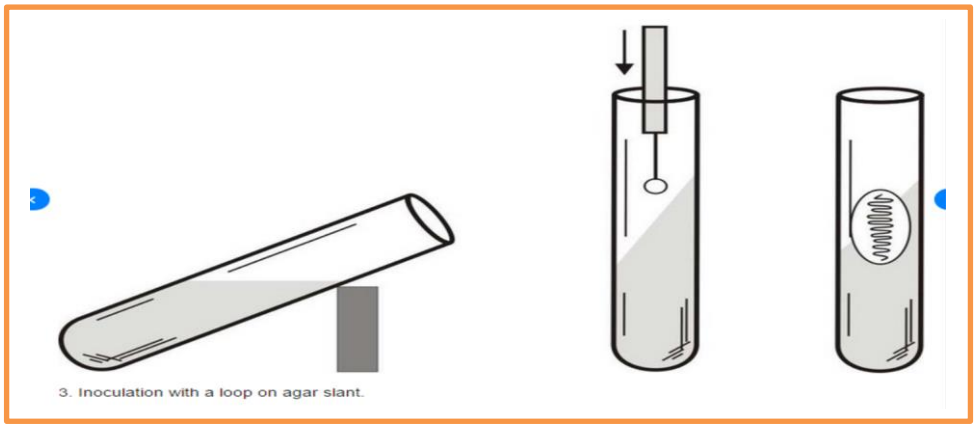


3- طريقة النشر في الطبق Spreading – plate method

وتتم بوضع قطرة من عالق البكتريا المخفف على سطح الوسط الزرعي قرب المركز ثم تنشر بأستخدام (الناشر الزجاجي على شكل حرف L) المعقم .

4- طريقة الاكار المائل Agar – slope method

يتم تحضير الاكار المائل وذلك بوضع انبوبة الاختبار الحاوية على الوسط الزرعي الصلب مثل الاكار المغذي بصورة مائلة على سطح المنضدة بزاوية ميلان 30 درجة او اقل للحصول على سطح مائل slant فقط لغرض حفظ البكتريا لفترة زمنية تصل الى 3- 4 اسابيع وايضاً لدراسة قابلية البكتريا على انتاج الغازات . بينما اذا اردنا الحصول على سطح مائل وتقعر slant & bult فيتم وضع الانبوبة بزاوية اكثر من 30 درجة ويستفاد منها لزرع البكتريا بطريقة الطعن Stabbing .



ثالثاً/ النمو على الوسط شبه الصلب Growth on semi-soild media

تتميز بعض البكتريا بقابليتها على اسالة (تمييع) الجيلاتين ، وذلك بعد الحضن في وسط الجيلاتين لمدة اسبوع او اكثر ، وهذه تعد صفة تشخيصية بالإضافة الى معرفة حركة البكتريا فيما اذا كانت البكتريا متحركة ام غير متحركة .

المحاضرة رقم (6)

المستعمرات البكتيرية Bacterial colonies

يمكن دراسة المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط الصلب من خلال :

1- **الشكل Shape :** تتخذ المستعمرات البكتيرية اشكالا مختلفة منها (شعاعية ، دائرية ، خيطية نقطية ، غير منتظمة ، جذرية ، مغزلية) .

2- **الحافة Edge :** وتكون على اشكال (كاملة ، مموجة ، مفصصة ، مسننة ، مجعدة ، خيطية) .

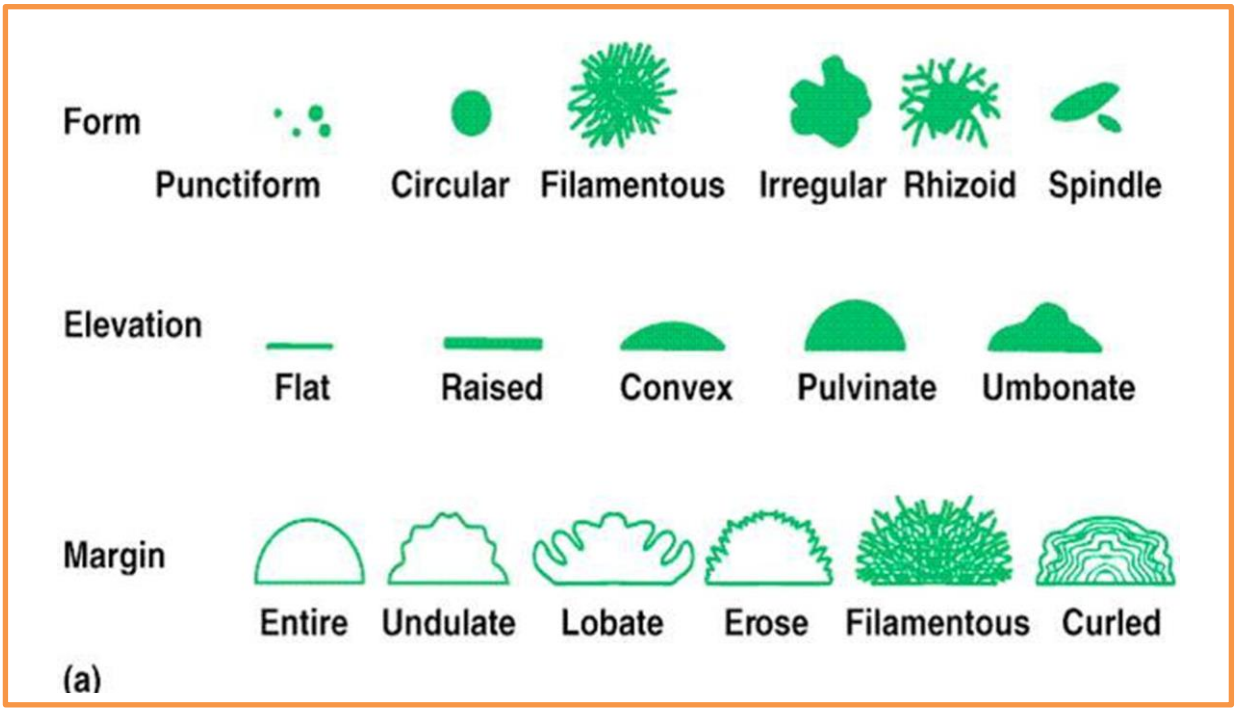
3- **الارتفاع Elevation :** ويقصد به ارتفاع سطح المستعمرة وتكون (مسطحة ، مرتفعة ، محدبة، كثيرة التحدب ، مرتفعة المركز) .

4- الحجم Size : ويقصد به قطر المستعمرة بالمليمتر ، اذ تتراوح بين (اقل من 1 مليمتر الى اكثر من 3 ملم) وذلك حسب نوع البكتريا .

5- التركيب السطحي Surface structure : ويكون املس او خشن او حبيبي .

6- اللون والعتمة Color and opacity : وقد تكون شفافة او نصف شفافة او معتمة .

7- **القوام Consistency :** قد تكون المستعمرة لزجة (مخاطية) ، هشة ، زيتية



المحاضرة رقم (7)

B- التشخيص المجهري للبكتريا Microscopic diagnosis of bacteria

ويتم باستخدام الصبغات البكتيرية Bacterial staining

تقسم الصبغات البكتيرية المستعملة في التصبيغ الى ثلاثة مجاميع :

1- الصبغات البسيطة Simple stains

A- الصبغات القاعدية Basic stains :

B- الصبغات الحامضية Acidic stains

2- الصبغات التفريقية (المركبة) Differential (compound) stains

A - صبغة غرام Gram

B stain - الصبغة المقاومة للحامضAcid fast stain

3 –صبغات التراكيب Structural stain

A- صبغة الابواغ Spore stains

B–صبغة المحفظة Capsule stain

سيتم تناول الصبغات المذكورة اعلاه بالتفصيل:

1- الصبغات البسيطة Simple stains

ان للصبغات البسيطة دور مهم في التعرف على شكل البكتريا ، حجمها ، ترتيبها ، وبالتالي تساعد في التشخيص الاولي للبكتريا ، وتشمل هذه الصبغات مايلي:

A- الصبغات القاعدية :- الصبغات هي عبارة عن املاح ، والاملاح بصورة عامة تتكون من ايونات موجبة وايونات سالبة . ان وجود اللون في الايون الموجب من الصبغة يعني ان الصبغة قاعدية وبما ان الخلية البكتيرية مشحونة بشحنة سالبة فأنها سوف تتحد مع الايون الموجب للصبغة والمسؤول عن اللون مثال على الصبغات القاعدي هي صبغة ازرق المثيلين Methylen blue

B- الصبغات الحامضية : اذا كان اللون محمول على الايون السالب من الصبغة ، فأن الصبغة تعد حامضية ، مثل صبغة الحبر الهندي وصبغة النيكروسين المستخدمتان في صبغ المحفظة البكتيرية .

طريقة العمل للصبغة البسيطة

1- تحضر شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة وجافة
2- نضع قطرة صغيرة من المزرعة البكتيرية السائلة بواسطة الناقل الحلقي على الشريحة ، بينما لو اخذت البكتيريا من مزرعة صلبة ففي هذه الحالة توضع قطرة من الماء على الشريحة وتمزج جيدا مع جزء المستعمرة المأخوذة بواسطة الناقل .
3- تنشر العينة على الشريحة بواسطة غطاء الشريحة لغرض تكوين طبقة رقيقة .
4- نجفف المسحة بالهواء او بواسطة مجفف السلايد .
5- نثبت المسحة وذلك بأمرار الشريحة فوق اللهب ثلاث مرات .
6- نضيف عدة قطرات من الصبغة المراد استعمالها (ازرق المثيلين ، البنفسجي البلوري ، الكاربول فوكسين ، السفرانين).
7- نغسل الشريحة بالماء بهدوء ، ثم نجفف الشريحة ، وتفحص بالعدسة الزيتية .

2- الصبغات التفريقية (المركبة) : يقصد بالصبغة التفريقية هو استخدام اكثر من صبغة واحدة للتمييز بين مجموعات بكتيرية مختلفة ، ومن اشهر هذه الصبغات :

A - صبغة كرام Gram stain:

تعد هذه الصبغة من اهم الصبغات البكتيرية ، لانها مكنت من تقسيم البكتريا الى مجموعتين كبيرتين هي : موجبة لصبغة كرام Gram positive (G+) او سالبة لصبغة كرام Gram negative (G-) ، استنادا الى اختلاف اللون الذي تأخذه البكتريا في هذه الصبغة حيث يعزى ذلك الى تركيب جدار البكتريا الموجبة الذي يحتوي على طبقات سميكة من مادة Peptidoglycan مقارنة بالبكتريا السالبة الذي يحتوي جدارها على نسبة اعلى من الدهون Lipids مقارنة بالبكتريا الموجبة ، كما ان جدار البكتريا السالبة يكون اقل سمكاً من الموجبة.

لذلك فأن البكتريا الموجبة تأخذ لون الصبغة الاولى والتي هي الكريستال البنفسجي الزرقاء، Crystal violet وعند اضافة الايثانول فأن الطبقة الدهنية في البكتريا السالبة تذوب مما يؤدي الى زيادة حجم الثقوب الموجودة مما يسمح بخروج الصبغة من هذه البكتريا وتأخذ الصبغة المغايرة وهي صبغة السفرانين الحمراء Safranin.

طريقة العمل صبغة كرام Gram stain

1- تكرر خطوات عمل الصبغة البسيطة من 1-6 ثم تضاف صبغة الكريستال البنفسجي الى الغشاء البكتيري بعد تثبيته على الشريحة .

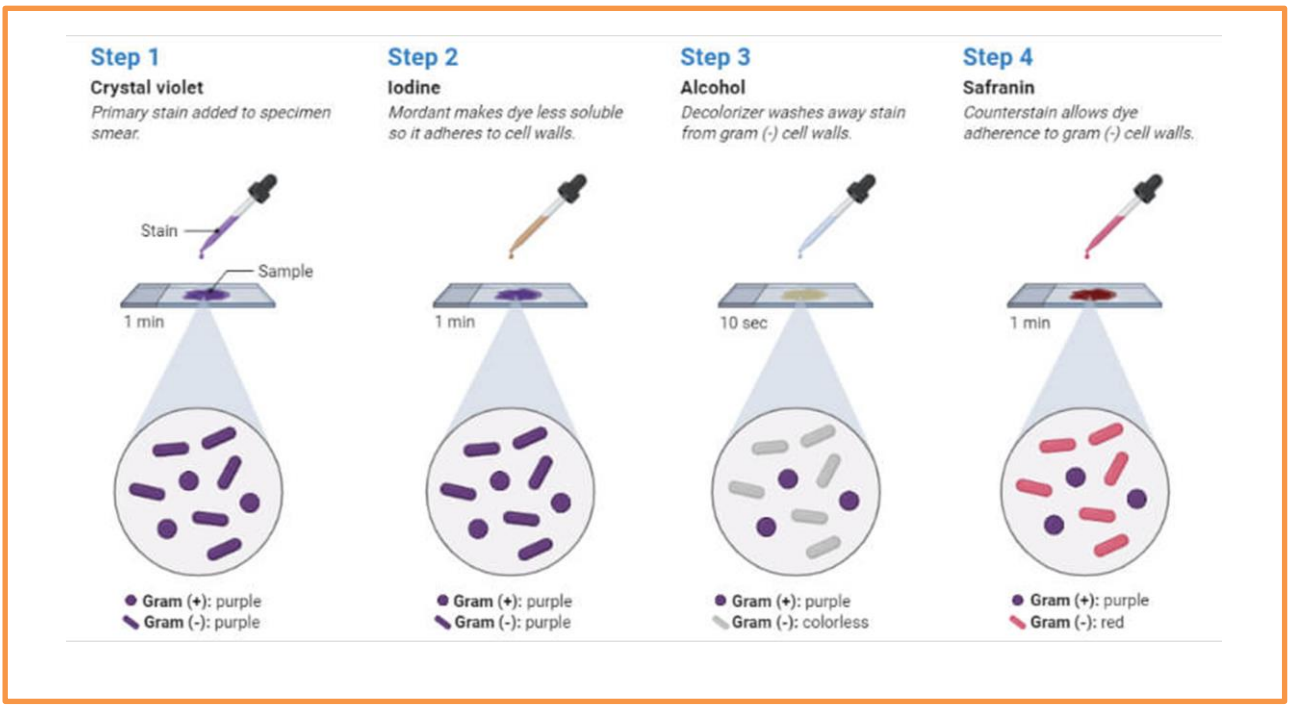
2- بعد دقيقة واحدة يتم غسل هذه الصبغة بالماء ثم تضاف كمية من اليود (وهي مادة مثبتة للصبغة)

3- بعد دقيقة واحدة تقريبا ، يتم سكب اليود من على الشريحة ، وعند هذه المرحلة يلاحظ ان كلتا المجموعتين البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام تبدوان باللون البنفسجي الغامق .

4- غسل الشريحة بالكحول الاثيلي او محلول Ethanol-acetone وهو مزيل للصبغة ويلاحظ ان الغسيل بهذه المادة يؤدي الى ازالة الصبغة من بعض الخلايا البكتيرية الموجودة على الشريحة دون بعضها الاخر.

5- غسل الكحول من الشريحة ، ثم تصبغ بصبغة السفرانين (صبغة حمراء) لمدة 45 ثانية ، وتغسل بالماء وتجفف ثم تفحص بالعدسة الزيتية .

6- البكتريا التي تظهر باللون البنفسجي هي موجبة كرام والتي باللون الاحمر هي سالبة كرام .



المحاضرة رقم (8)

B - الصبغة المقاومة للحامض Acid fast stain واشهرها صبغة زيل نيلسون Ziehl–Neelsen stain

تستخدم هذه الطريقة لصبغ انواع معينة من البكتريا تتبع الى جنس الـ Mycobacterium مثل بكتريا السل الرئوي *Mycobacterium tuberculosis* والبكتريا المسببة للجذام *Ieprea Mycobacterium* حيث ان هذه الانواع من البكتريا يصعب صبغها بصبغة جرام ،لان جدارها الخلوي يحتوي على مواد معقدة كالدهون والاحماض الدهنية والشمع ، لهذا السبب يجب استخدام صبغات قوية لصبغ هذه البكتريا لكي تستطيع اختراق الجدار الخلوي لهذه البكتريا . وسميت بـ Acid fast stain لانها تقاوم ازالة الصبغة بالمزيلات امثال الحامض والكحول .

طريقة العمل لصبغة زيل نيلسون

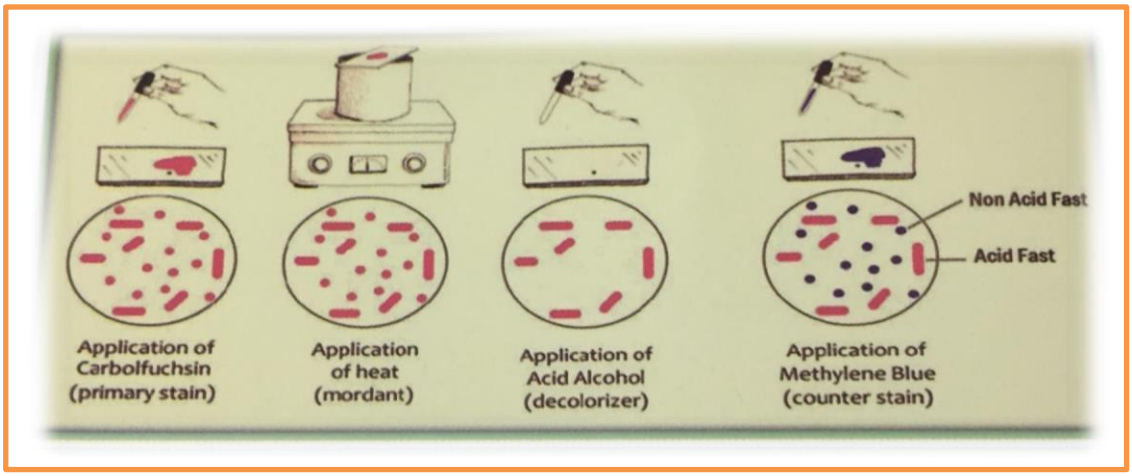
1-توضع العينة المراد صبغها على شريحة وتثبت بواسطة تمريرها على اللهب .

2-نغطي الشريحة بصبغة حمراء قوية تسمى كاربول فوكسين Carbol fuchsin ونسخن الشريحة حتى تبدأ الصبغة بالتبخر ، وتترك الشريحة على اللهب لمدة 5 دقائق مع اضافة الصبغة وعدم السماح لها بأن تجف ، ومن ثم تغسل الشريحة بالماء.

3- تغطى الشريحة بمحلول (كحول 95% HCl in 3%) لمدة دقيقة واحدة ، ومن ثم تغسل الشريحة بالماء .

4- توضع صبغة زرقاء تسمى ازرق المثيلين Methylene blue لمدة نصف دقيقة .

5- النتيجة النهائية تكون بأن عصيات السل الرئوي مصبوغة باللون الاحمر وباقي الشريحة مصبوغة باللون الازرق .



3- صبغات التراكيب Structural stain :

تستخدم لصبغ بعض العضيات التي توجد في البكتريا مثل الابواغ البكتيرية والمحفظة ومنها :

A - صبغ الابواغ الداخلية للبكتريا Endospore stain

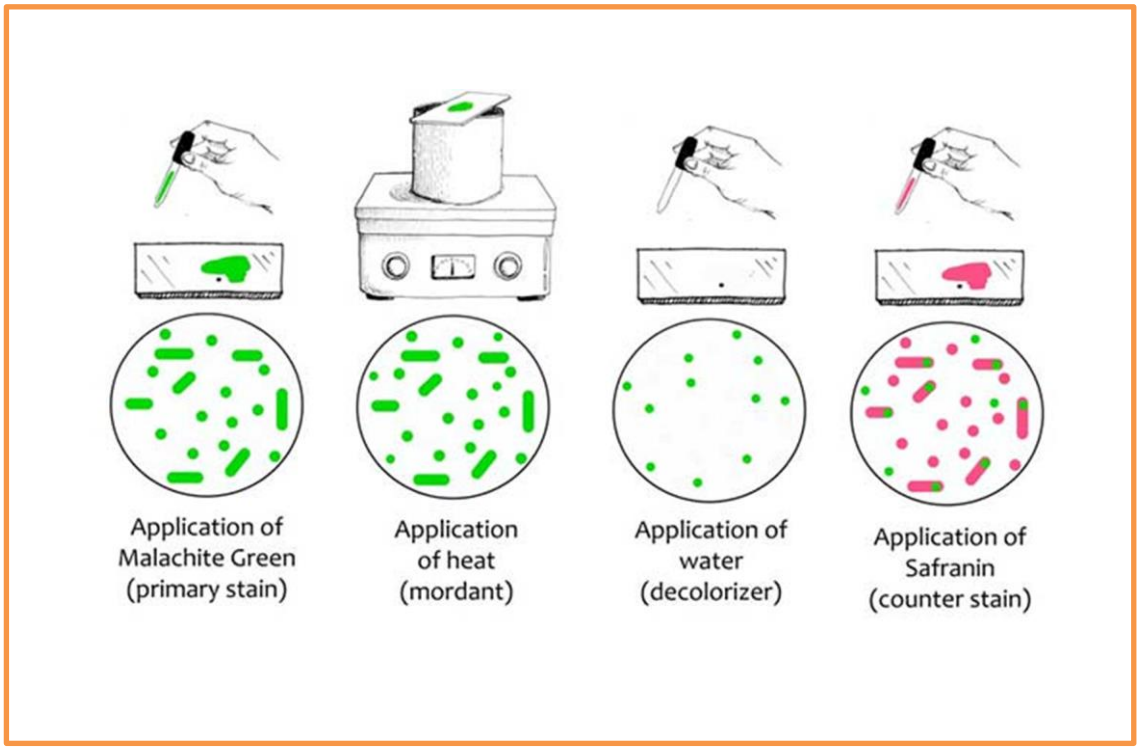
طريقة العمل :-

1- نحضر الشريحة ونثبت النموذج باللهب .

2- نغطي الشريحة بصبغة الـ (Malachite green) تركيزها 5% ونسخن الشريحة لمدة 5 دقائق ، ومن ثم تغسل بالماء .

3- نضع صبغة Carbol fuchsin لمدة نصف دقيقة او صبغة السفرانين لمدة دقيقة وتسمى الصبغة في هذه الحالة بـ Counter stain.

4- النتيجة النهائية تكون بأن الابواغ الداخلية تصبغ باللون الاخضر وباقي الشريحة باللون الاحمر .



المحاضرة رقم (9)

B- صبغ المحفظة Staining of Capsule

المحفظة **Capsule** هي منطقة هلامية تحيط بالجدار الخلوي من الخارج ، ويطلق عليها المحفظة او الطبقة الخارجية او الطبقة الهلامية Slime layer ، يختلف سمك الغلاف في البكتريا المغلفة ، وقد لايوجد الغلاف اصلاً في البكتريا غير المغلفة . تتركب مادة الغلاف في معظم الحالات من متعدد السكريات Polysaccharides.

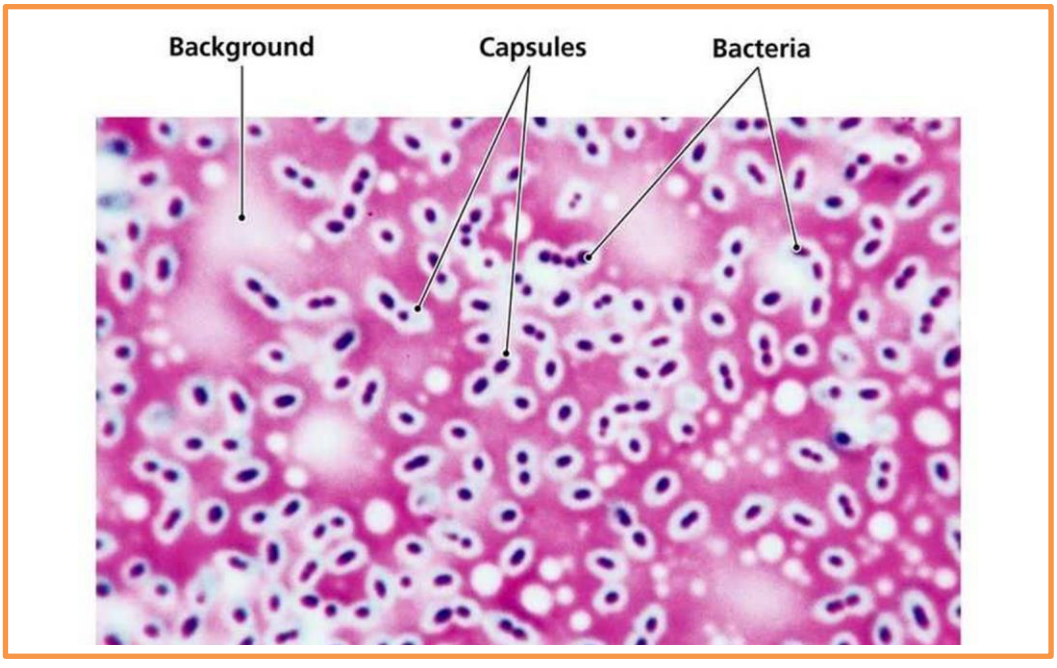
الطريقة الاولى :-

1- يحضر غشاء بكتيري لمزرعة حديثة ويترك الغشاء ليجف في الهواء (لا تستخدم الحرارة)
2- يصبغ الغشاء بمحلول مائي لصبغة الكريستال البنفسجي لمدة 2 دقيقة .
3- يغسل الغشاء بمحلول كبريتات النحاس بتركيز 20% .
4- تترك الشريحة لتجف في الهواء تماماً.
5- يفحص الغشاء تحت المجهر .
6- تظهر الخلايا بلون ازرق غامق بينما تظهر طبقة الغلاف (Capsule) كهالة زرقاء باهتة.

الطريقة الثانية :-

1- ضع قطرة من مزرعة بكتيرية سائلة ،او مستعمرة بكتيرية مع قطرة ماء وامزجها جيدا

2- يضاف اليها قطرة من صبغة الحبر الهندي او النيكروسين وتخلط مع البكتريا جيدا ثم تغطى بغطاء الشريحة وتفحص بالعدسة الزيتية .



دراسة حركة البكتريا بواسطة القطرة المعلقة Hanging drop technique

تقسم البكتريا من حيث قدرتها على الحركة الى بكتريا متحركة Motile وبكتريا غير متحركة Non-motile ، ونظرا لوجود عضيات حركية للبكتريا المتحركة والتي تسمى الاسواط Flagella فأن هذه الانواع البكتيرية تكون متحركة حركة حيوية **Vital movement** **او تسمى حركة حقيقية** ، ويمكن دراسة هذه الاعضاء الحركية بواسطة تحضير القطرة المعلقة **Hanging drop technique**

* يجب استخدام مزارع بكتيرية حديثة الزرع ،لا يتجاوز عمرها 18 ساعة لان البكتيريا تفقد قدرتها على الحركة بتقدم العمر .

طريقة العمل :

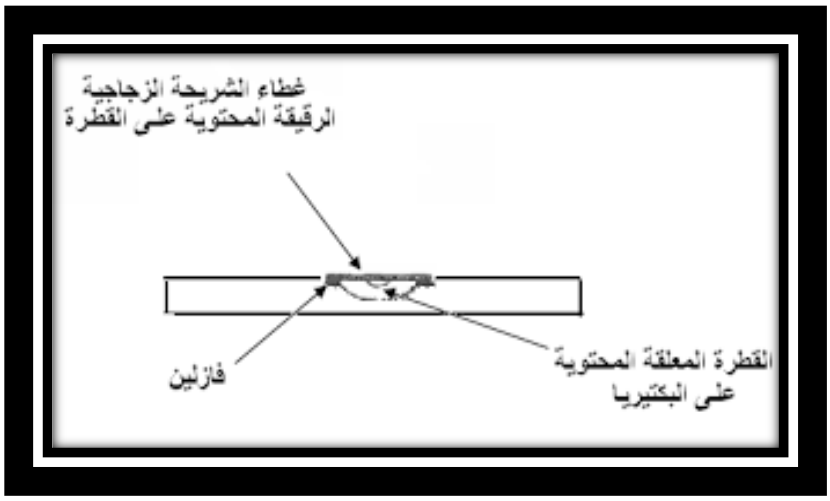
1- ينقل بأبرة التلقيح ذات العقدة نقطة صغيرة من المزرعة البكتيرية حديثة العمر نشطة النمو الى مركز غطاء شريحة نظيف .

2- يوضع في اركان الغطاء نقط صغيرة من الفازلين .

3- توضع الشريحة المقعرة فوق الغطاء ثم تقلب الشريحة بأحتراس بحيث تكون النقطة المعلقة في منتصف التقعير بدون ملامسة قاع الشريحة .

4- توضع الشريحة على المجهر ويتم الفحص عند حافة القطرة مع مراعاة تقليل الاضاءة .

5- يتم الفحص بأستخدام العدسة الزيتية .



المحاضرة رقم (10)

C- تشخيص البكتريا باستخدام الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

اولاً : مجموعة اختبارات الاندول – احمر المثيل – فوكس بروسكاور – السترات
(IMVIC)   INDOL – METHYIE RED – VOGES PROSKAUER – CITRATE TEST
وتشمل : -

1- اختبار الاندول Indol test

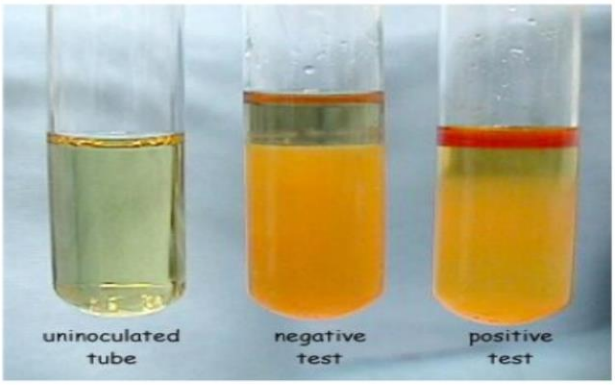
يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة البكتريا على تكسير الحامض الاميني Tryptophan الموجود في الوسط الزرعي الغذائي وهو الـ Peptone water بواسطة انزيم Tryptophanase وينتج عنه حامض البيروفيك والاندول والامونيا والذي يظهر بشكل حلقة حمراء اعلى الانبوبة

طريقة العمل :

1- أخذ مستعمرة بكتيرية نامية في وسط زرعي صلب مثل الاكار المغذي Nutrient agar او و توضع في وسط ماء الببتون Peptpn water ، ثم تمزج معاً في انبوب زجاجي .
2- تحضن في الحاضنة مدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م
3- يضاف الى الانبوب (1) مل من كاشف كوفاك Kovak's reagent، ثم تقرأ النتيجة .

النتيجة :
البكتريا + الكاشف في حالة ظهور حلقة حمراء أعلى الانبوب = نتيجة موجبة .
البكتريا + الكاشف في حالة عدم ظهور حلقة حمراء اعلى الانبوب = نتيجة سالبة .

ملاحظة : يستخدم هذا الفحص للتفريق بين بكتريا *E.coli* التي تعطي نتيجة موجبة للفحص وبكتريا الـ *Klebsiella* والتي تعطي نتيجة سالبة .



اختبار الإندول حلقة حمراء على
سطح البينة الموجبة (على اليمين) وحلقة صفراء السالبة(الوسط) مراقب على اليسار

2 - اختبار احمر المثيل Methyle red test

يستخدم فحص **احمر المثيل** لتحديد قدرة بعض انواع البكتريا على انتاج كمية كبيرة من الحامض عند تخمر الكلوكوز ، والتي بدورها ستخفض حموضة الوسط الغذائي الى درجة متدنية تصل الى اقل من 4 حيث سيتم تغيير لون الكاشف عند هذه الدرجة من الحموضة من الاصفر الى الاحمر .

طريقة العمل :-

1- يتم هذا الاختبار بتلقيح وسط MRVP بالبكتريا المراد اختبارها .

2- احضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ

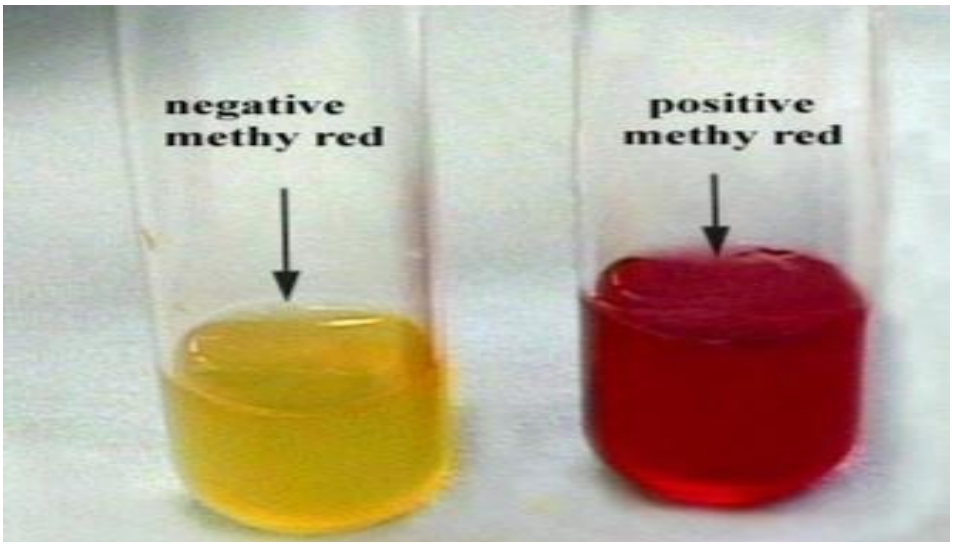
3- اضف (6-8) قطرات من كاشف احمر المثيل Methyl red reagent ثم ننتظر لمدة ساعة واحدة . ويتم قراءة النتيجة .

النتيجة :

اذا تحول لون الوسط الى الاحمر فان النتيجة موجبة

واذا بقى لون الوسط اصفر او برتقالي فان النتيجة سالبة .

ملاحظة : يستخدم هذا الفحص للتفريق بين بكتريا *E.coli* التي تعطي نتيجة موجبة للفحص وبكتريا الـ *Klebsiella* والتي تعطي نتيجة سالبة .



3- اختبار فوكس – بروسكاور Voges – Proskauer test

يستخدم هذا الاختبار لتحديد قدرة بعض انواع البكتريا على تخليق مركب متعادل يسمى Acetoin من الكلوكوز ، حيث يتم تكسير الكلوكوز بواسطة البكتريا لينتج حمض البايروفك الذي يتحول بعدها الى مادة الـ Acetoin.

طريقة العمل :-

1- يتم هذا الاختبار بتلقيح وسط MRVP بالبكتريا المراد اختبارها .

2- احضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ .

3- اضف (12) قطرة من محلول كاشف فوكس – بروسكاور A و (4) قطرات من كاشف فوكس – بروسكاور B . ثم ننتظر لمدة ساعة واحدة . ويتم قراءة النتيجة .

النتيجة :

اذا تغير لون الوسط الى الاحمر فان النتيجة موجبة ، واذا لم يتغير فان النتيجة سالبة .

ملاحظة : يستخدم هذا الفحص للتفريق بين بكتريا *E.coli* التي تعطي نتيجة سلبية للفحص وبكتريا الـ *Klebsiella* والتي تعطي نتيجة ايجابية .

4- اختبار استهلاك السترات Citrates test

يستخدم للكشف عن البكتريا التي لها القدرة على تكسير مادة السترات citrate بواسطة انزيم Citratase ، حيث تستهلك البكتريا مادة السترات كمصدر وحيد للحصول على الكاربون ، مما ينتج عنها مادة قلوية .يتم اجراء هذا الاختبار وذلك بتلقيح الوسط الزرعي Simmon's citrate agar الحاوي على دليل Bromothymol blue .

طريقة العمل :-

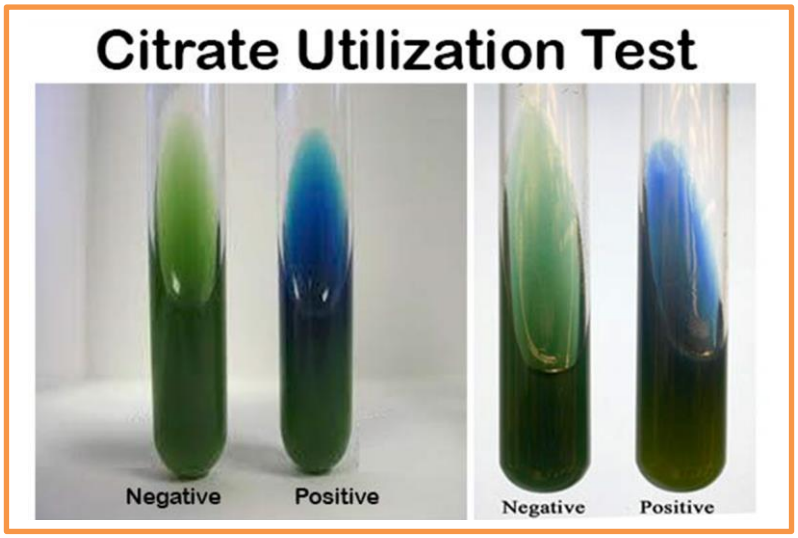
1- زرع البكتريا على وسط Simmon's citrate agar المائل .

2- احضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ، وبعد انتهاء فترة الحضن تقرأ النتيجة

النتيجة :

اذا تغير لون الوسط من الاخضر الى اللون الازرق = نتيجة موجبة .

اذ لم يتغير لون الوسط الى الازرق = نتيجة سالبة .



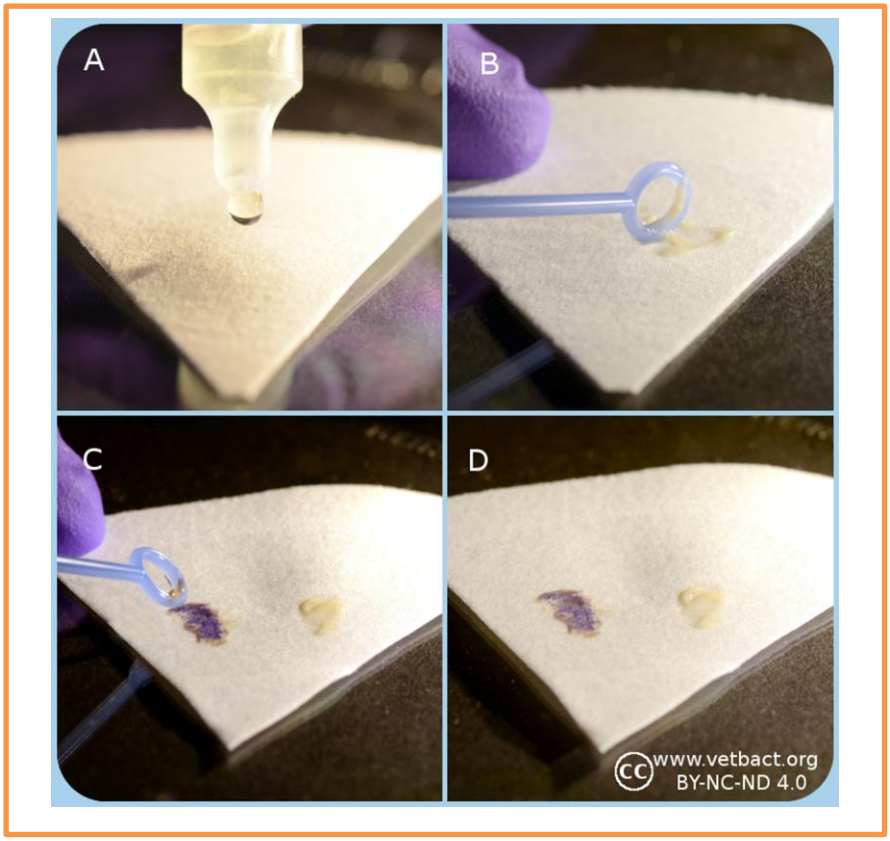
المحاضرة رقم (11)

ثانياً / اختبارات اخرى تستخدم في تشخيص البكتريا منها :-

1- اختبار الاوكسديز Oxidase test

يستخدم هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على افراز انزيم الاوكسديز ، يتم اجراءه من خلال وضع ورقة ترشيح في طبق بتري ثم نضع عليها قطرتان او ثلاثة من كاشف الاوكسديز ، وباستخدام اللوب المعقم ننقل جزء من المستعمرة البكتيرية الى ورقة الترشيح المذكورة ، ثم تمزج جيداً . ان تغير لون المستعمرة مع الورقة الى اللون البنفسجي دليل على ايجابية الاختبار ، وبالعكس فأن النتيجة تكون سالبة .

ملاحظة . تعتبر بكتريا *Staphylococcus , Niesseria* موجبة لهذا الاختبار .



2- اختبار الكتاليز test Catalase :

يستخدم هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكتاليز الذي يعمل على تكسير بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2الى اوكسجين وماء .

طريقة العمل :

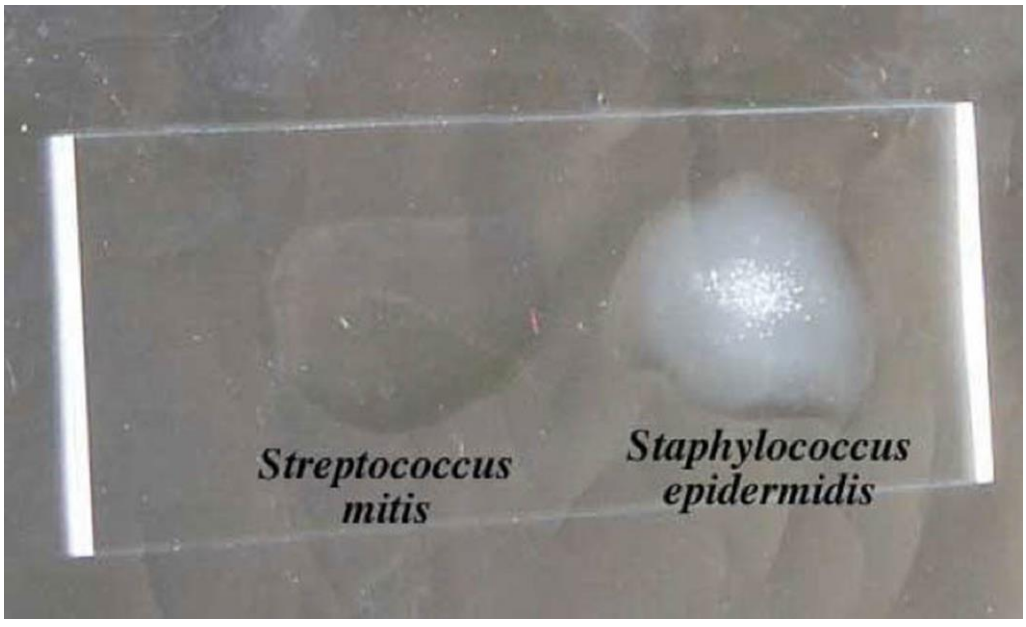
1- نضع مستعمرة بكتيرية على سلايد نظيف ومعقم .

2- ثم يضاف اليها قطرات من كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وتمزج جيداً بواسطة الناقل .

النتيجة :-

ان ظهور فقاعات الاوكسجين حول المستعمرة البكتيرية دليل على ايجابية الاختبار ، في حين عدم ظهور هذه الفقاعات يدل على ان الفحص سالب .

ملاحظة : يستعمل هذا الفحص للتمييز بين بكتريا *Staphylococcus , Streptococcus*



3- اختبار اليوريز Urease test

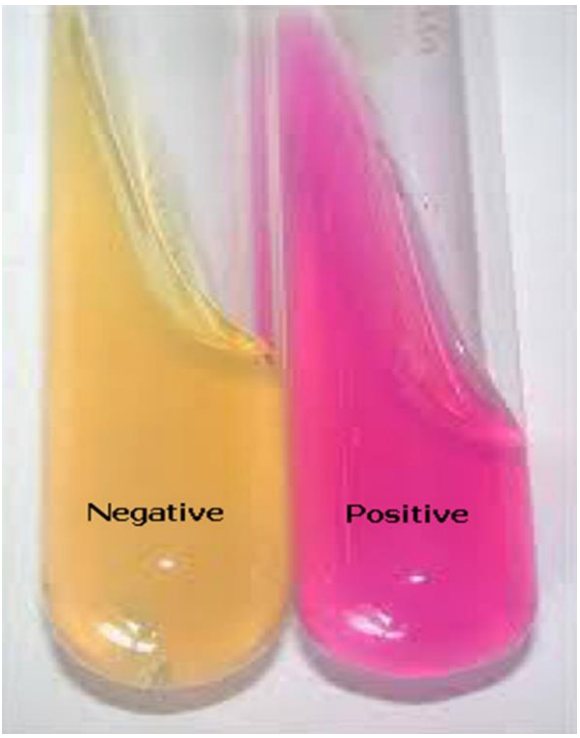
يستخدم هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز الذي يعمل على تحلل جزيئة اليوريا الى امونيا .

يجري هذا الاختبار عن طريق تلقيح الوسط الزرعي (وسط اكار اليوريا المضاف اليه اليوريا المعقم بالترشيح قبل تصلبه) بالبكتريا المراد فحصها بعملية الطعن والتخطيط في وسط اكار اليوريا المائل . يستعمل هذا الفحص للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز الذي يعمل على تحليل اليوريا المضافة الى الوسط الزرعي فتزداد قاعدية الوسط **وبالتالي يتغير لونه من الاصفر الى الاحمر الكرزي .**

ملاحظة : يستعمل للتمييز بين بكتريا *Proteus* , *Salmonella*.

Proteus تنتج اليوريز تغير لون وسط Urea agar ← اللون الاحمر الكرزي

Salmonella لا تنتج اليوريز لاتغير لون وسط Urea agar ← اللون الاصفر



المحاضرة رقم (12)

4- فحص التحلل المائي للنشا Starch hydrolysis test

- يستخدم هذا الفحص للتحري عن قدرة البكتريا على تحليل النشا الذي هو مادة كربوهيدراتية معقدة متعددة سكريات .
- يتم الكشف عن وجود النشا بأضافة محلول اليود حيث يتكون لون ازرق
- تعتمد الكائنات الحية على انزيم الاميليز في تحليل النشا .

طريقة العمل :

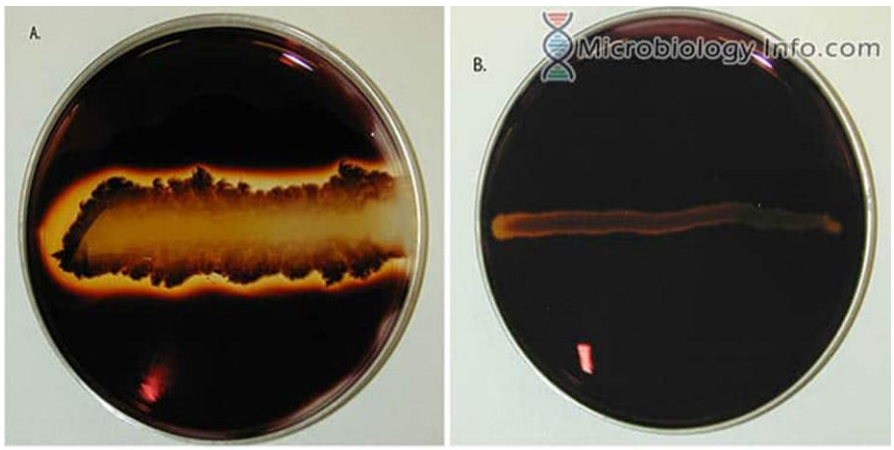
1- يحضر طبق بتري يحتوي على اكار النشا

2- يخطط الطبق بالبكتريا المراد فحصها ، يجب ان يكون التخطيط كثيفاً

3- تحضن الاطباق في الحاضنة مدة 24 ساعة ودرجة حرارة 37 م°.

4- نكشف عن قدرة البكتريا على تحليل النشا بأضافة اليود.

5- وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري يدل على قدرة البكتريا على تحلل النشا .



Starch hydrolysis (+ve) Starch hydrolysis (-ve)

5- اختبار تحلل الكازائين Casein test

- يعتبر الكازائين من البروتينات الرئيسية الموجودة في الحليب ، ويوجد على شكل عالق غروي ، وهو المسؤول عن اعطاء اللون الابيض للحليب
- تمتلك العديد من البكتريا انزيمات محللة لهذا البروتين الى مواد ذائبة وتسمى هذه العملية بالببتنة peptonization وتعني التحلل المائي الجزئي للبروتين .

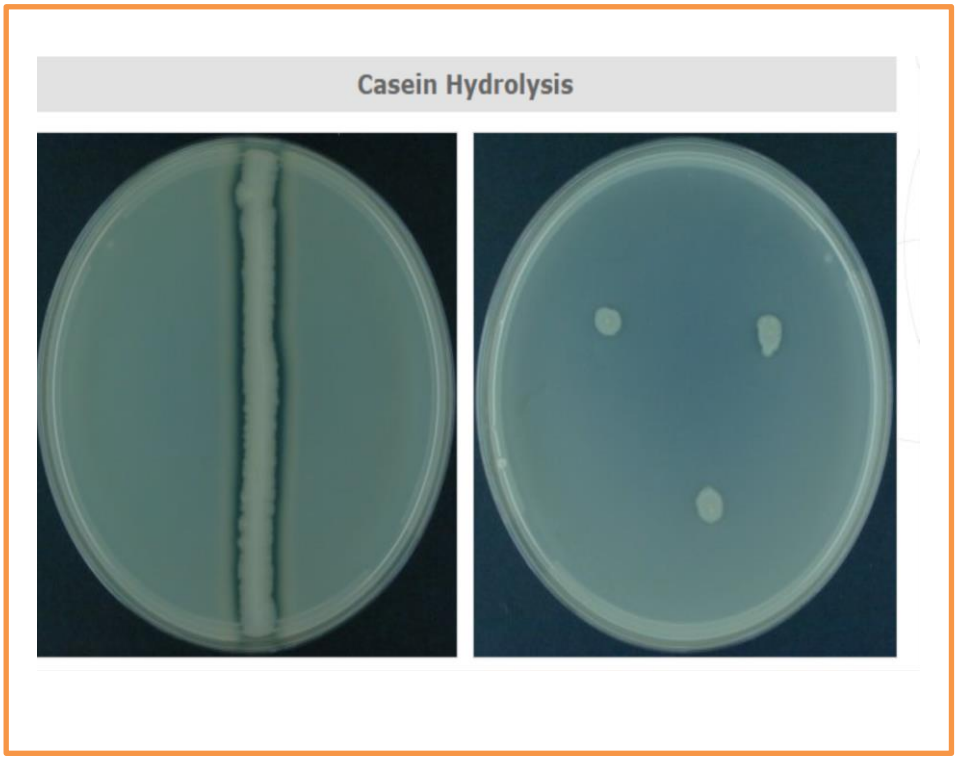
طريقة العمل :

1- يحضر طبق يحوي وسط اكار اللبن .

2- يلقح منتصف الطبق ببكتريا حديثة العمر بابرة التلقيح .

3- يحضن الطبق في الحاضنة مدة 24 ساعة لمدة 24-48 ساعة

4- تسجل النتيجة ، عند وجود هالة شفافة حول النمو البكتيري دلالة على ان البكتريا حللت الكازئين بافراز انزيم Caseinase ، اما اذا لم تظهر الهالة فيعني ان الفحص سالب .



المحاضرة رقم (13)

6- فحص اسالة الجيلاتين Gelatin liquefaction test

يستخدم هذا الفحص لدراسة قدرة البكتريا على تحلل الجيلاتين الذي هو مادة بروتينية محضرة من التحلل المائي للكولاجين . بعض انواع البكتريا قادرة على انتاج انزيم خارجي Gelatinase الذي يحلل الجيلاتين .

طريقة العمل :

1-يحضر انبوب اختبار تحتوي على كمية مناسبة من الجيلاتين (وسط + جلاتين)
Nutrient agar + gelatin

2- تلقح الانبوبة بالبكتريا المراد فحصها ، بطريقة الوخز .

3- تحضن الانبوبة في الحاضنة مدة 48-72 ساعة ودرجة حرارة 37 م .

4- نكشف عن قدرة البكتريا على تحلل الجيلاتين بوضع الانابيب في وعاء مبرد ويترك لمدة 15 دقيقة ،ثم تمسك الانبوبة ويتم امالتها .

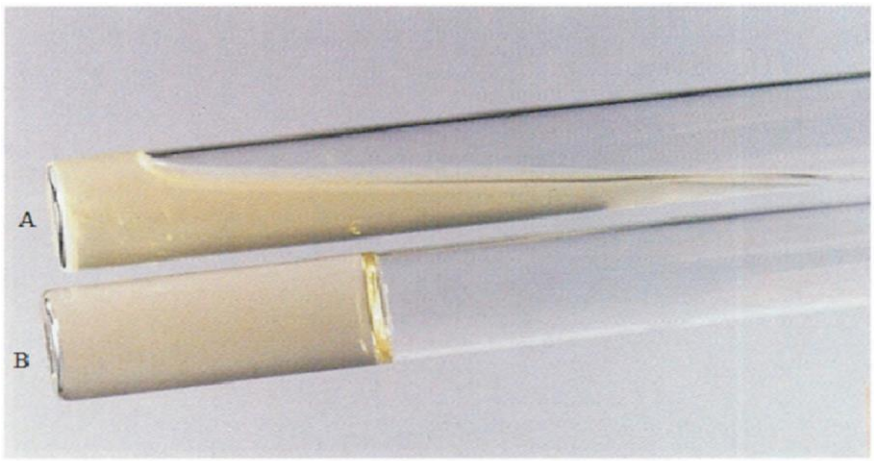


Fig. Nutrient Gelatin Stabs.
A. Positive:
B. Negative:

7- فحص انزيم التجلط Coagulase enzyme test

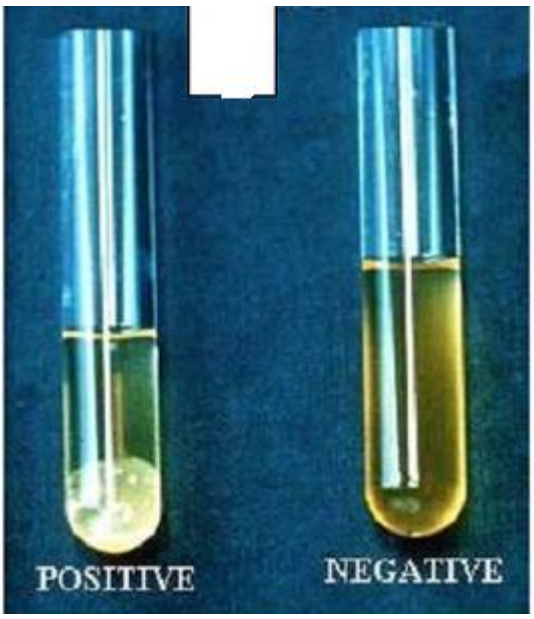
يستخدم هذا الفحص لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم التجلط ، حيث يستخدم للتمييز بين المكورات العنقودية المرضة pathogenic والغير ممرضة non- pathogenic ، يؤدي هذا الانزيم الى تخثر Coagulation بلازما الدم حيث يحول مادة الفيبرينوجين Fibrinogen الموجودة في البلازما الى فيبرين Fibrin.

طريقة العمل :

1- ينقل 0.5 مل من البلازما الى انبوبة اختبار معقمة .

2- يضاف كمية من المزروع البكتيري الحديث .

3- تحضن عند 37م لمدة 24 ساعة مع مراعاة فحص الانبوبة كل نصف ساعة حتى تظهر علامات التخثر .



8- فحص تحلل الدهون Lipid hydrolysis test

يستخدم هذا الفحص لدراسة قدرة البكتريا على تحلل الدهون بسبب قيامها بأفراز انزيم lipase الذي يقسم جزئ الدهن الى كليسرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية .

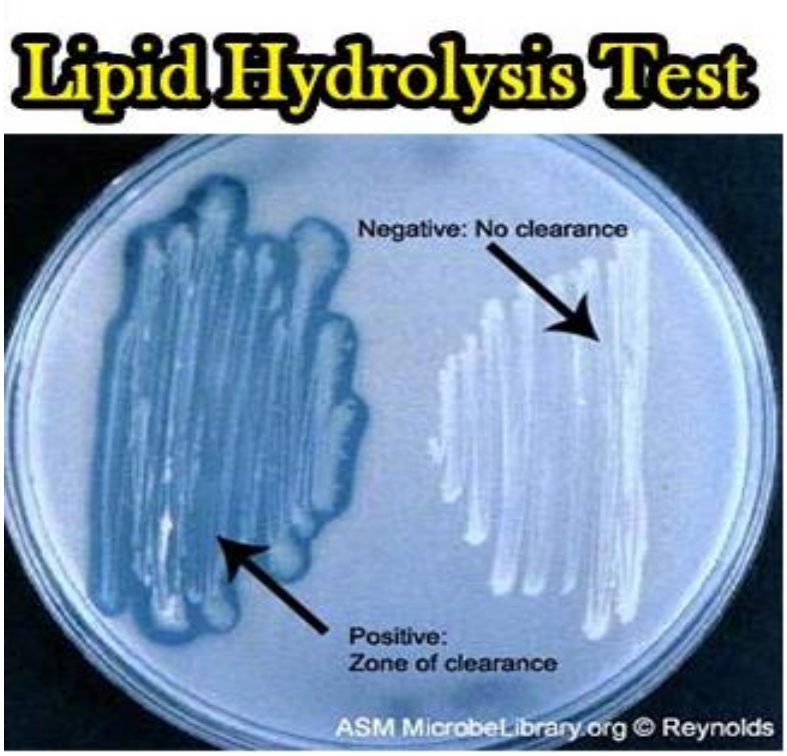
طريقة العمل :

1- يأخذ طبق يحتوي على وسط اجار الدهن ، ويلقح بمزرعة حديثة العمر بأبرة تلقيح

2- يحضن الطبق عند 37 م لمدة 96 ساعة

3- يكشف عن قدرة البكتريا في تحلل الدهون باضافة كمية من محلول كبريتات النحاس 10-20 % لمدة 10 دقائق ، ثم يتخلص من المحلول .

4- ظهور لون ازرق مخضر على النمو البكتيري دليل على قدرة البكتريا على تحليل الدهن بأفرازها للانزيم المحلل .



9- فحص تحلل الحمض النووي DNase test

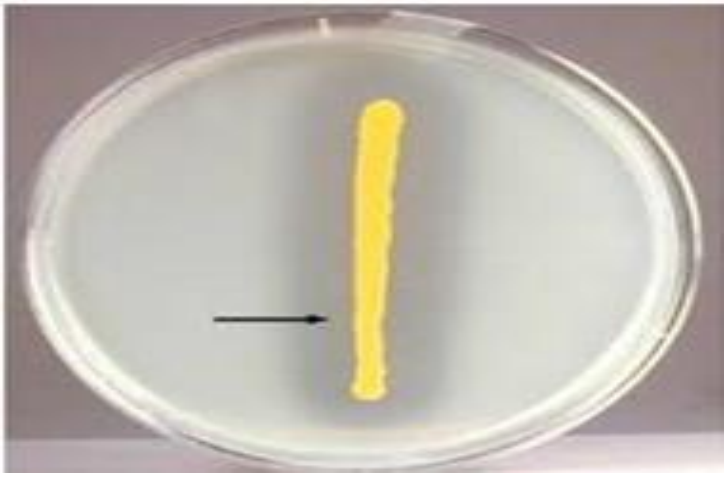
يستخدم هذا الفحص لمعرفة قدرة البكتريا على افراز انزيم DNase الذي يلعب دوراً اساسياً في عملية تحلل المادة النووية DNA - ومن خلال هذا الفحص يتم التمييز البكتريا المحللة للمادة الوراثية DNA حيث تتكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على ان البكتريا انتجت انزيم DNase للوسط الخارجي وحللت مادة الدنا في البيئة

طريقة العمل

1- يحضر طبق بتري يحتوي على بيئة اكار المغذي المضاف اليها الـ DNA .

2- يلقح الطبق بمزرعة بكتيرية حديثة العمر ويحض 24 ساعة عند 37م لمدة 24 ساعة

3- يكشف عن تحلل الـ DNA بأضافة (1N Hcl) ، تكون مناطق شفافة حول النمو البكتيري دليل على ان البكتريا انتجت انزيم DNase للوسط الخارجي وحللت الـ DNA.



المحاضرة رقم (14)
D - التشخيص باستخدام نظام API 20

يستخدم هذا النظام للتشخيص السريع للبكتريا المعوية على مستوى الجنس والنوع اذا يعد من اكثر الطرق القياسية والدقيقة في تصنيف البكتريا ، يحتوي على 20 تجويف صغير بيها بيئات جافة ينتج عنها التفاعل الحيوي مع البكتريا (تفاعلات الانزيمات الاصلية) .

طريقة العمل :

1- بواسطة ابرة التلقيح المعقمة ينقل من المزرعة البكتيرية الحديثة النقية الى انبوبة بيها ماء معقم وترج جيدا .
2- تملا التجاويف الموجودة في صندوق تحضين الشريط بالماء ، ثم يوضع الشريط الذي على الاختبارات فوق الحامل الخاصة بها .
3- ينقل من العالق البكتيري الى التجاويف الصغيرة مع اتباع الملاحظات الخاصة بكل اختبار .
4- يغطى الشريط بالغطاء الخاص به ، ثم يحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعى
5- تضاف الادلة الخاصة بالاختبارات TDA-IND-VP .
6- تقرا النتائج مع تسجيلها .

API 20 E after incubation...Positive results for all tests :

Microbiology Info.com

API 20 E after incubation...Negative results for all tests :

READING THE API 20: قراءة النتائج

TESTS	SUBSTRATE	REACTION TESTED	- RESULTS	+ RESULTS
ONPG	ONPG	beta-galactosidase	Colorless	Yellow
ADH	Arginine	arginine dihydrolase	Yellow	red/orange
LDC	Lysine	lysine decarboxylase	Yellow	red/orange
ODC	Ornithine	ornithine decarboxylase	Yellow	red/orange
CIT	Citrate	citrate utilization	pale green/yellow	blue-green/blue
H2S	Na thiosulfate	H2S production	colorless/gray	black deposit
URE	Urea	urea hydrolysis	Yellow	red/orange
TDA	Tryptophan	Deaminase	Yellow	brown-red
IND	Tryptophan	indole production	Yellow	red (2 min.)
VP	Na pyruvate	acetoin production	Colorless	pink/red (10 min.)
GEL	charcoal gelatin	Gelatinase	no diffusion of black	black diffuse
GLU	Glucose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
MAN	Mannitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
INO	Inositol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
SOR	Sorbitol	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
RHA	Rhamnose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
SAC	Sucrose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
MEL	Melibiose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
AMY	amygdalin	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
ARA	arabinose	fermentation/oxidation	blue/blue-green	Yellow
OX	oxidase	Oxidase	colorless/yellow	violet

المحاضرة رقم (15)

D – تشخيص البكتريا باستخدام جهاز Vitek 2

يستخدم هذا الجهاز لتاكيد تشخيص العزلات البكتيرية بدقة اكثر تصل الى (99%) اذ يتضمن الجهاز 64 اختبار كيميوحيوي تستعمل لتشخيص العزلات البكتيرية وفقا لتعليمات الشركة المصنعة يعتمد اساس عمل هذا الجهاز على الاختبارات الكيموحيوية .

طريقة العمل :

1- اختيار مستعمرة مفردة نقية من العزلات البكتيرية المراد اختبارها والنامية مسبقا على وسط اكار المغذي ، تنقل بواسطة مسحة معقمة الى انبوبة معقمة تحتوي على (3) ملليتر من المحلول الملحي لغرض التخفيف وتكون محمولة على حامل خاص مع الجهاز ، ويتم مزجها جيدا بواسطة المازج لغرض الحصول على عالق بكتيري متجانس .

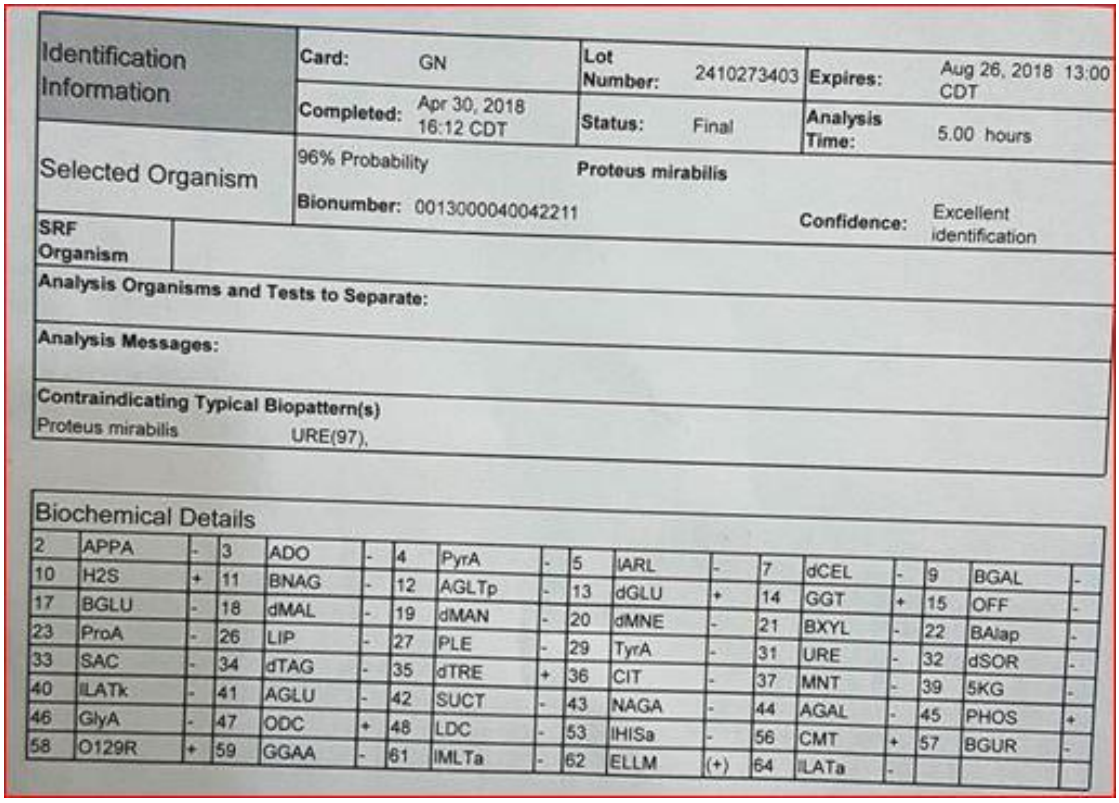
2- قياس عكورة العالق البكتيري بجهاز (Vitek 2 DENSICHEK) بحيث تكون عكورة العالق مساوية الى (0.5 – 0.63) .

3 - وضع الكارت المخصص بالبكتريا بحسب نوعها اذا كانت سالبة لصبغة كرام يوضع كارت الخاص بها Vitek 2 GN card واذا كانت موجبة يوضع Vitek 2 GP card داخل الانابيب ثم وضعت الانابيب المحتوية على العالق البكتيري في Vitek 2 Cassette .

4- نقل (Vitek 2 Cassette) يدويا إلى الجهاز لغرض تشخيص البكتريا من خلال تسجيل نتائج 64 حفرة Well تحتوي كل حفرة على وسط معين لاجراء فحص كيموحيوي محدد .

5- ظهور نتيجة تشخيص العزلة المفحوصة بعد مرور24 ساعة من وضع العينة في الجهاز مع تحديد مستوى التشخيص باعطاء نسبة احتمالية معينة لكل عزلة .

نموذج لقراءة النتائج



Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410273403	Expires: Aug 26, 2018 13:00 CDT		
	Completed: Apr 30, 2018 16:12 CDT	Status: Final	Analysis Time: 5.00 hours		
Selected Organism	96% Probability	Proteus mirabilis			
	Bionumber: 0013000040042211		Confidence: Excellent identification		
SRF Organism					

Analysis Organisms and Tests to Separate:

Analysis Messages:

Contraindicating Typical Biopattern(s)

Proteus mirabilis URE(97),

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	+	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	-	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	(+)	64	lLATa	-			

المحاضرة رقم (16)

اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة

Bacterial Susceptibility test to Antibiotics

تعرف المضادات الحياتية على انها مواد كيميائية عضوية تنتجها الكائنات الدقيقة خاصة الفطريات وتقوم بقتل كائنات دقيقة أخرى مثل البكتريا . لها أهمية في علاج الامراض المايكروبية حيث تستعمل كنوع من المواد الكيمياوية الطبيعية العلاجية ، وتقسم الي عمل المضادات الى قسمين : مثبطة او موقفة لنمو الجراثيم Bacteriostatic و قاتلة للجراثيم Bactericidal .

تستخدم العديد من الطرق لتحديد هذا الاختبار الا ان الطريقة الاكثر شيوعا تعرف بطريقة Bauer Kirby والتي تستخدم لتحديد درجة حساسية مختلف أنواع البكتريا لمضادات الحياة المستعملة وبالتالي تساعد على اختيار نوع المضاد المناسب للعلاج.

طريقة العمل :

1. تحضر اطباق بتري تحتوي اكار المولر هنتون ويحضر معلق للمزرعة بكتيرية حديثة العمر بواسطة ابرة تلقيح معقمة ويؤخذ مقدار من المزرعة ويوضع في انبوبة تحتوي على محلول فسجلي للحصول على تركيز متكافئ وترج الانبوبة .
2. يلقح سطح الطبق بالمعلق البكتيري بواسطة Cotton swab.
3. توضع أقراص المضادات الحياتية على ابعاد متساوية على سطح الطبق الملقح بالمزرعة البكتيرية بواسطة ملقط معقم بالتلهيب .
4. تحضن الاطباق مقلوبة عند 37م لمدة 24 ساعة .
5. نلاحظ مناطق التثبيط Inhibition zone حول الأقراص ثم يقاس قطرها بالمسطرة لتعيين المضاد الأكثر فاعلية ضد البكتريا المستخدمة ، وانعدام فاعلية المضاد على البكتريا يعني ان البكتريا مقاومة Resistant وتكون بكتريا حساسة Sensitive في حالة تأثرها بالمضاد.

طريقة Kirby Bauer