

المحاضرة السابعة - درس الأحياء المجهرية المتقدم - الجزء العملي-

تشخيص البكتريا Identification of Bacteria

إن نمو وتكاثر البكتريا ينتج عن تمثيل المواد الغذائية في الوسط بالاستعانة ببعض الانزيمات التي تعطي الكائن المجهرى هويته (قدرته على استهلاك المواد المتوفرة في الوسط الغذائي) وجود أو انعدام هذه الأنزيمات هو الذي يحدد إمكانية استخدام المواد الخام (المواد الغذائية) والمتوفرة في البيئة والاستفادة منها كمصدر للطاقة، أو بناء التراكيب الخلوية،... الخ. وبذلك تتحكم الأنزيمات بالتغيرات البايوكيميائية التي تحصل داخل الخلايا وخارجها مثل نوع السكر المستهلك، نوع التنفس (هوائي أو لاهوائي)، القدرة على تكسير الأحماض

الأمينية أو البروتينات وقابليتها على تحلل الدهون ويعتمد تشخيص البكتريا Identification على عدد من الفحوصات العملية التي تجرى لتحديد التصنيف العلمي (الاسم العلمي) الذي تنتمي إليه العزلة المجهولة تتضمن هذه الإجراءات:

1. عزل البكتريا على البيئات المختبرية المناسبة وبشكل نقي Pure Culture

2. دراسة الشكل المظهري للمستعمرات (حجم، لون، شكل، قوام، ... الخ).

3. تصبغ البكتريا.

4. الاختبارات البايوكيميائية.

5. التنميط السيرولوجي.

6. التنميط العائلي.

يعد عزل البكتريا بشكل نقي وتصبيغها بصبغة كرام أو غيرها حسب نوع الإصابة هناك مجموعة من الاختبارات البايوكيميائية للتفريق بين المجاميع المتقاربة فيما بينها في الصفات المورفولوجية والفسيلولوجية مثال: البكتريا المعوية Enterobacteriaceae وهي مجموعة من البكتريا تتواجد في أمعاء الإنسان وبعض اللبائن الأخرى خلاياها عبارة عن عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام ، غير مكونة للسبورات يعتبر تشخيص هذه البكتريا من الأولويات الضرورية لتشخيص بعض الأمراض لا التي تنتقل عن طريق المياه أو الغذاء. ممكن تقسيم هذه المجموعة إلى ثلاث أقسام:

1- الممرضة Pathogens مثل أفراد جنس Salmonella, Shigella

2- الممرضة أحياناً Occasional Pathogens مثل أفراد جنس Klebsiella و Proteus

3- الفلورا الطبيعية للأمعاء Normal Intestinal flora مثل جنس Escherichia و Enterobacter.

اختبارات IMViC

وهي مجموعة من أربعة اختبارات بايوكيميائية تستخدم للتفريق بين أفراد البكتريا المعوية:

فحص إنتاج الاندول • I : Indole production test .

فحص الميثيل الاحمر • M : Methyl Red Test .

فحص فوكس بروسكاور • V : Voges Proskauer test .

لسهولة التلفظ • I : For easier pronunciation .

فحص استهلاك السترات • C : Citrate utilization test .

1- اختبار إنتاج الأندول Indole Production test:

الغرض من الاختبار: التحري عن انواع البكتريا المنتجة لإنزيم Tryptophanase محلل الحامض الاميني التربتوفان الموجود في الوسط ليعطي الاندول، حامض البايروفيك والامونيا. البكتريا تستخدم حامض البايروفيك والامونيا كمتطلبات للنمو اما الاندول فيتراكم في الوسط.

الوسط المستخدم: ماء البيبتون Pepton water وهو وسط سائل يحتوي على بيتون 20 غم (غني بالحامض الاميني

التربتوفان)- كلوريد الصوديوم 5 غم - 1 لتر ماء مقطر PH = 7.4

اما وسط (SIM) Semisolid Indol Motility وهو وسط نصف صلب يلحق بطريقة الطعن Stabbing

يلحق أحد الأوساط أعلاه بالبكتريا ثم يحضن بدرجة 37 ° م لمدة 24 ساعة.

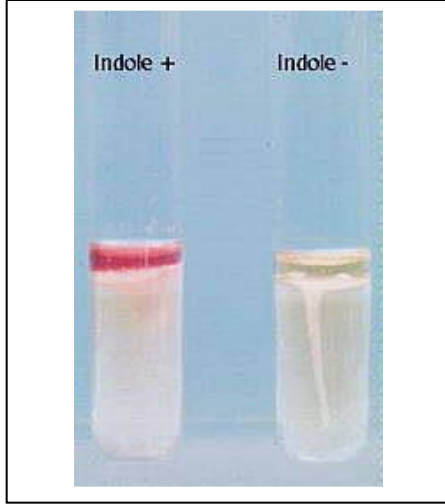
الكاشف Kovac's Reagent والذي يتكون من :

كحول اميلي او ايزواميلي 150 سم³

10 غم P- dimethylaminobenzaldehyde

حامض الهيدروكلوريك المركز 50 سم³

تضاف خمسة قطرات من أحد الكواشف بعد انتهاء فترة التحضين يستدل على إنتاج الأندول بظهور حلقة حمراء نتيجة إنتاج الأندول من الوسط وتفاعله مع الكحول المحمض وبالتالي تكوين معقد مع P- Dimethylaminebenzaldehyde الأحمر اللون (النتيجة الموجبة) مثال *Escherichia coli* أما النتيجة السالبة فهي عدم ظهور اللون الأحمر مثال : *Enterobacter aerogenes*.



2- اختبار المثيل الأحمر Methyl Red Test:

الغرض من الاختبار لتحديد قابلية البكتريا على أكسدة الكلوكوز وإنتاج تراكيز عالية من النواتج النهائية الحامضية كذلك للتمييز بين الأنواع المؤكسدة للكلوكوز مثل *Escherichia coli* و *Enterobacter aerogenes* بالرغم من أن جميع افراد البكتريا المعوية تستهلك الكلوكوز (كمصدر للطاقة) إلا أنها تختلف فيما بينها في النواتج النهائية وحسب الأنظمة الأنزيمية (التي تمتلكها كل بكتريا) مع الكلوكوز إلى حامض وقد تستمر في إنتاجها للحوامض العضوية وبتراكيز عالية من الفورميك Formic Acid ، حامض الخليك Acetic Acid ، حامض السكسينيك

إضافة إلى بعض الغازات مثل CO₂, H₂ والنااتجة من تفكك حامض Formic Acid تدعى هذه العملية التخمر المختلط Mixed Acid fermentation . أما الأجناس الأخرى فهي أيضا تستهلك السكر ولكن بإنتاج مواد متعادلة (نواتج نهائية) بعملية تدعى fermentation butandiol .

معظم أجناس البكتريا المعوية تنتج وفي المراحل المبكرة للتحضين نواتج نهائية عبارة عن حوامض عضوية ولكن في حالة *Escherichia coli* مثلاً تستقر هذه النواتج لتؤدي إلى انخفاض PH الوسط إلى 4.4 أو أقل ، بينما بكتريا *Enterobacter aerogenes* تحول هذه الحوامض أنزيمياً إلى نواتج متعادلة في نهاية فترة التحضين، هذه النواتج المتعادلة قد تكون Ethanol، Acetoin (acetylmethylcarbinol) وتؤدي إلى ارتفاع PH الوسط إلى 6 تقريباً .

الوسط المستخدم: وسط ماء البيتون والكلوكوز والفوسفات Glucose phosphate peptone water (MR – VP medium) وهو وسط سائل يحتوي على 5 غم/لتر كلوكوز

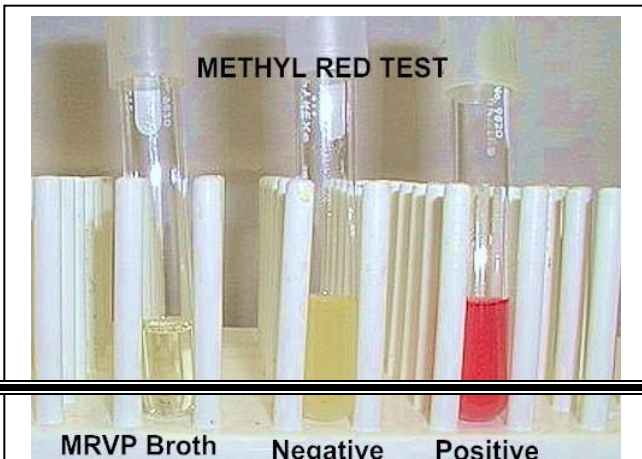
ويتكون من: بيتون 5 غم - املاح الفوسفات ثنائية البوتاسيوم 5 غم - كلوكوز 10% 50 سم³ يعقم بالترشيح ماء مقطر 1 لتر - PH = 7.6 ويحضن في درجة 37 م لمدة 24-48 ساعة .

ويتكون الكاشف Methyl Red من :

صبغة المثيل الاحمر 0.1 غم - كحول الايثانول 300 سم³ - ماء مقطر 200 سم³

أفضل كاشف يتحسس لهذه القيمة الحامضية 4.4 أما عند PH 6 توجد بعض الحوامض ولكن تركيز أيون الهيدروجين يكون واطئ لذلك يعطي اللون الأصفر النتيجة السالبة للاختبار مثل بكتريا *Enterobacter aerogenes*.

النتيجة الموجبة: تحول لون الوسط إلى اللون الاحمر خاصة في الطبقات العليا الملامسة للهواء وعند رج الأنبوبة يتحول الوسط كله إلى اللون الاحمر حسب كمية الاوكسجين مثال بكتريا *Escherichia coli*.



3- اختبار Voges – Proskauer

الغرض من الاختبار للكشف عن البكتريا التي تستهلك الكلوكون بطريقة تخمر البيوتاندايول Butandiol fermenters حيث يتكون في الوسط مركبات butandiol, acetoin وقليل من الحوامض العضوية مما يؤدي إلى انخفاض بسيط في PH الوسط.

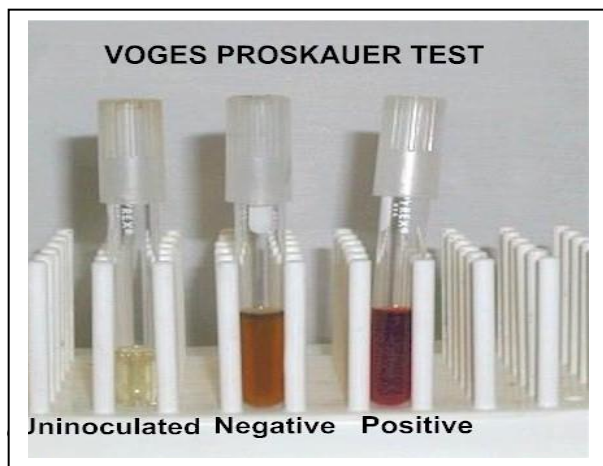
ينتج عن تخمر الكلوكون بهذه الطريقة مركب Acetyl Methyl Carbinol المعروف Acetoin والذي قد يتأكسد ليعطي Diacetyl أو يخترل إلى Butylenglycol.

الوسط المستخدم MR-VP medium Glucose phosphate peptone water يحضن بعد التلقيح لمدة 48 ساعة.

الكاشف O'meara reagent أو Barritt's reagent: الكاشف يحتوي على خليط من alpha-alcoholic naphthol و 40% KOH للكشف عن مركب Acetyl Methyl Carbinol يجب أولاً أن يتأكسد إلى diacetyl وهذا يحصل بوجود alpha-naphthol ومجموعة الكواندين guanidine الموجودة في بيتون الوسط النتيجة ستكون ظهور اللون الوردي بعد 15 دقيقة من إضافة الكاشف.

النتيجة الموجبة: اللون الوردي مثال البكتريا *Enterobacter aerogenes*

النتيجة السالبة عدم ظهور اللون الوردي أي بقاء لون الوسط أصفر شاحب مثال بكتريا *Escherichia coli*



4- Citrate Utilization test:

الغرض من الاختبار: للكشف عن البكتريا القادرة على استهلاك (تخم) وحيد للنيتروجين. عند غياب الكلوكون أو اللاكتوز بعض البكتريا لها للحصول على الطاقة هذه القدرة تعتمد على وجود أنزيم ermease داخل الخلايا حيث تكسر جزيئات السترات بأنزيمات داخل الخلايا

العملية CO₂ الذي يتفاعل مع الصوديوم والماء ليعطي كاربونات الصوديوم القاعدية وبذلك ترتفع PH للوسط مما يؤدي إلى تغير لون الكاشف الموجود ضمن مكونات الوسط Bromothymol Blue من الأخضر إلى الأزرق. الوسط Simmons Citrate Agar وهو وسط صلب مائل أخضر في حالة التعادل هذا الوسط هو الوحيد ضمن اوساط اختبارات IMViC الذي يحتوي على الكاشف ضمن مكونات الوسط.

اسم الدليل داخل الوسط هو Bromothymol Blue Indicator الذي يكون لونه أخضر في الوسط المتعادل، أزرق بالقاعدي، أصفر بالحامضي. النتيجة الموجبة تحول لون الوسط من الأخضر إلى اللون الأزرق كما في بكتريا

Enterobacter aerogenes.

النتيجة السالبة: يبقى لون الوسط أخضر كما في حالة بكتريا *Escherichia coli*.

تحلل الكازين Casein hydrolysis

الهدف من التجربة: تمييز الانواع البكتيرية المحللة للكازين وقدرة البكتيريا على تحليل الكازين. الكازين هو البروتين السائد في اللبن (يعطي اللون الابيض) الكثير من البكتيريا تفرز الانزيم الخارجي Caseinase الذي يحلل الكازين الى مواد ذائبة شفافة

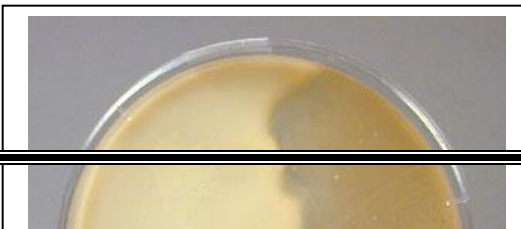
طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم

1- نأخذ 2 طبق يحوي وسط اكار اللبن

2- يلقح منتصف الطبق ببكتيريا حديثة العمر بآبرة التلقيح (الطبق الاخر كنترول)

3- يحضن الطبق مقلوب عند 37 م لمدة 24 - 48 ساعة

4- تسجل النتيجة بعد التحضين مباشرة اذا لاحظت وجود هالة شفافة حول



النمو البكتيري يدل على ان البكتيريا حللت الكازين بإفراز انزيم الكازينيز
وإذا لم يوجد منبقة رائحة حول النمو دليل على عدم قدرة البكتيريا على
تحلل الكازين

تحلل الدهون Lipid hydrolysis

اسم التجربة: اختبار قدرة البكتيريا على تحلل الدهون

الهدف من التجربة: التعرف على قدرة الانواع البكتيرية على تحليل الدهون

قدرة البكتيريا على تحليل الدهون راجع الى افراز انزيم Lipase الحي

يقسم جزيء الدهن الى جزيء كليسرول و3 جزيئات من 3 احماض دهنية

طريقة العمل: تحت ظروف التعقيم

- 1- ناخذ 2 طبق يحتوي بيئة اكار الدهن يلفح وسط الطبق بمزرعة حديثة العمر بآبرة التلقيح والطبق الثاني كنترول
- 2- يحضن الطبق عند 37 م لمدة 96 ساعة
- 3- يكشف عن قدرة البكتيريا هلى تحلل الدهن بإضافة كمية من محلول كبريتات النحاس
10% - 20 لمدة 10 دقائق ثم تخلص من المحلول.
- 4- ظهور لون أزرق مخضر على النمو دليا على قدرة البكتيريا على تحليل الزيت بإفرازها للإنزيم المحلل



اختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation

يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات الهامة في تشخيص وتميز
بايوكيميائية ينتج عنها طاقة وان قدرة البكتيريا على تخمير الس
تشخيص البكتيريا.

الاحياء المجهرية التي تستخدم المركبات العضوية كمصدر لط

1-التنفس Respiration وهي عملية استهلاك كلي (اكسدة)

الكاربون وماء وتتم تحت ظروف هوائية.

2-التخمير Fermentation وهي عملية (لا تحتاج إلى أوكا

نوع البكتيريا، اذ تنتج حوامض، كحولات، الديهايد، غازات مختلفة، ثنائي اوكسيد الكاربون وهيدروجين، وميثان .

السكريات وخاصة الكلوكوز هي من المركبات الاكثر شيوعا التي تستخدمها الاحياء المجهرية المخمرة اضافة إلى مواد
اخرى مثل الحوامض العضوية، الاحماض الامينية،... الخ. ومن الجدير بالذكر ان استهلاك احد السكريات يتطلب
مجموعة من الانزيمات:

أ-انزيمات خارجية exoenzymes وهي التي تعمل خارج الخلية التي انتجتها.

ب-انزيمات داخلية endoenzymes وهي التي تعمل داخل الخلية

كلا النوعين يعملان حسب نوع السكريات في حين السكريات الاحادية قادرة على الانتشار عبر غشاء الخلية، الوحدات
الاكبر مثل السكريات الثنائية أو المتعددة تتطلب انزيمات خارجية لتكسيرها إلى وحدات اصغر أو انزيمات قادرة على
نقلها عبر الغشاء داخل الخلية permeases وبعد دخولها إلى الخلية تتعرض إلى انزيمات داخلية تحولها إلى وحدات
اصغر.

طريقة العمل:

1-تحضر اوساط زرعية سائلة Ex: Phenol Red Carbohydrate Broth

تحتوي على نوع واحد من السكريات مثل الكلوكوز (سكر احادي) السكروز، المالتوز، اللاكتوز (سكريات ثنائية)، نشا،
وكلايوجين واکار (سكريات متعددة).

2-يجب ان يحتوي الوسط على دليل الفينول الاحمر للكشف عن تخمر السكر حيث يعطي في الوسط الحامضي اللون
الاصفر وفي الوسط القاعدي اللون الوردي وفي المتعادل اللون الاحمر.

3-للكشف عن انتاج الغازات يضاف إلى الوسط انبوب درهام Durham Tube بشكل مقلوب قبل التعقيم. وهو عبارة
عن انبوبة صغيرة تعمل على:

أ-توفير ظروف لاهوائية بداخلها.

ب-لحصير الغازات الناتجة عن التخمر

4-تلقح هذه الانابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م.

*عند تحضير وسط السكريات يعقم الوسط السائل (قبل توزيعه على الانابيب وإضافة Durham Tube) بالموصدة بدرجة حرارة 121 م لمدة 15 دقيقة. اما محلول السكر فيعقم بطريقة الترشيح ثم يضاف الى الوسط المغذي السائل يتم توزيع فيما بعد على الانابيب وبداخل انابيب درهام معقمة.

د. صلاح ناجي عزيز