المحاضرة الثامنة - درس الأحياء المجهرية المتقدم -الجزء العملي-

اختبار Triple Sugar Iron Agar (TSI)

اختبار مهم جداً يفرق بين اجناس البكتريا المعوية اسم الاختبار يدل على اسم الوسط أي الاكار الحاوي على 3 انواع من السكريات يحتوي هذا الوسط على 0.1% سكر الدكستروز(الكلوكوز)، 1% سكروز ، 1% لاكتوز، اضافة الى مركب كبريتات الحديدوز وكاشف الفينول الاحمر، اضافة الى ان الوسط غني بالفيتامينات يكون هذا الوسط على شكل مائل Slant يتم تلقيحه على شكل طعنه تتبع بتخطيط السطح المائل يستخدم للكشف عن الاختبارات التالية:

1-تخمر السكريات:لاحظ ان هذا الوسط يحتوي على نسب معينة من 3 سكريات كما مبين اعلاه خلال الساعات الاولى من التحضين تبدأ البكتريا المخمرة للكلوكوز بخفض PH للوسط إلى اقل من 6.8 نتيجة لذلك يتحول لون الوسط وبسبب احتوائه على الدليل الفينول الاحمر إلى اللون الاصفر .وفي حالة كون البكتريا مخمرة للكلوكوز فقط يصبح الوسط المائل اصفر بالقاعدة Butt واحمر على السطح المائل نتيجة لتعرضه للهواء مما يؤدي إلى اكسدة الببتون الموجود في الوسط وتكوين امينات قاعدية لتعادل كمية الحامض المنتج سابقا ثم تحويله إلى القاعدي بعد 24 ساعة حضانة.

اما إذا كانت البكتريا لها انزيمات خاصة بتخمير السكريات اللاكتوز أو السكروز أو كلاهما ستقوم بمهاجمة هذه السكريات بعد نفاذ الكلوكوز لذلك يصبح الوسط كله (المائل والقاعدة) اصفر.

2-الكشف عن الغازات :البكتريا التي تحرر كميات كبيرة من غاز ثنائي اوكسيد الكاربون تكون فقاعات هوائية في الوسط ممكن ملاحظتها على اسفل أو جانبي الوسط بل قد تؤدي إلى تشقق الاكار أو اندفاعه إلى الاعلى في حالة انتاج البكتريا بكميات هائلة من الغازات.

تحلل الاحماض الامينية Amino Acids Hydrolysis

الاحماض الامينية هي ناتج تحلل البروتينات يمكن لبعض البكتيريا ان تحلل بعض هذه الاحماض الامينية محولة اياها الى مواد ابسط تركيبا .

اسم التجربة :اختبار قدرة البكتيريا على انتاج كبريتوز الهايدروجين S_2H Production

الهدف من التجربة :توضيم نشاط بعض البكتيريا في تحليل cyctine وإنتاج S_2H

بعض البكتيريا تنتج غاز كبريتوز الهايدروجين عند تحللها للحامض الاميني (Cysteine حامض اميني يحتوي على الكبريت) بواسطة افرازها لإنزيم Cysteine desulforase تستعمل بيئة كليجلر للكشف عن انتاج S_2H حيي تحتوي على كبريتات الحديدوز الذي يتفاعل مع S_2H مكونا راسب اسود من كبريتيد الحديدوز .

طريقة العمل :تحت ظروف التعقيم

1- نأخذ 2 انبوبة تحتوي على بيئة كليجلر Kligler

2- تلقح الانبوبة بطريقة الوخز بمزرعة بكتيرية حديثة *Proteus vulgaris* ويحتفظ بالأنبوبة الثانية بدون تلقيح

3- تحضن الانبوبة عند 37 - 30 م لمدة من 7 - 2 ايام .

4- تسجل النتيجة الموجبة على اساس وجود راسب اسود على طول خط الوخز في حالة تكون غاز H_2S الذي يتفاعل بدور مع كبريتات الحديدوز (في الوسط) لينتج راسب اسود اسفل الانبوبة كما يلاحظ تغير لون البيئة الاحمر إلى الاصفر نتيجة انخفاض قيمة PH بسبب تكون الاحماض $FeSO4 + H2 + S \rightarrow FeS + SO3 + H2O$

راسب اسود

الكشف عن انتاج الانزيم المحلل للجيلاتين Gelatinase

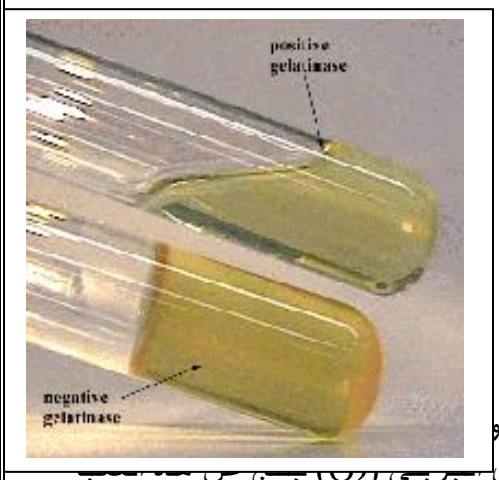
الجيلاتين هو بروتين ناتج عن التحلل الجزئي للكولاجين (وذلك بغلي الكولاجين وهو احد انواع الانسجة الرابطة) في الماء يتحول الى خليط ذائب من البتيدات المتعددة (الجلاتين) عند تحلل البروتين بواسطة انزيم Gelastinase إلى الحوامض الامينية بذلك يفقد خاصيته الغروية أي يتحول إلى السيولة ويبقى بهذا الشكل حتى بعد التبريد . الحوامض الامينية الناتجة تستخدم من قبل بعض البكتريا كمادة غذائية ، هذا الانزيم احيانا يكون فع تستطيع بعض الاحياء المجهرية الدقيقة ان تحلله بإنتاج انزيم خارجي حال للبرو

Gelatinase انتاج هذا الانزيم احيانا يرتبط بامراضية البكتريا حيث تستخدمه لتحطيم الانسجة الرابطة (الكولاجين) وبالتالي تنتشر في جسم المضيف.

المواد:

1-مزرعة سائلة لبكتريا . *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis*

2-وسط الجيلاتين المغذي (انابيب) .



طريقة العمل:

1-تلقح الانابيب بالبكتريا بطريقة الوخز او الطعن (باستخدام الابرة)

2-تحضر الانابيب بدرجة حرارة 35 م لمدة 24 - 48 ساعة

3-توضع الانابيب في الثلاجة لمدة نصف ساعة أو في ماء مثلج لمدة 5 دقائق.

4-امسك الانابيب بحذر بشكل مائل ثم لاحظ سطح الوسط إذا كان على شكل سائل يعتبر الاختبار موجب اما إذا بقي الوسط بشكل صلب اسوة بأنبوبة السيطرة (وسط غير ملقح) يعتبر الاختبار سالب .

الكشف عن انزيم الاوكسيديز Oxidase Test

تلعب أنزيمات Oxidase دوراً هاماً في عملية نقل الإلكترونات خلال التنفس الهو
Oxidase يسرع عملية أكسدة Cytochrome (المختزل) بوساطة الأوكسجين الجزيئي (O_2) لينتج عن هذه العملية
تكوين H_2O و H_2O_2 أي أن البكتريا التي تمتلك أنزيم Cytochrome Oxidase هي موجبة للاختبار .البكتريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية المحبة للكميات القليلة من الهواء Microaerophilic تكون منتجة لانزيم Oxidase يستخدم هذا الاختبار في تمييز جنسي Neisseria و Pseudomonas الموجبة للاختبار عن أفراد العائلة المعوية السالبة له.

اذاً أنزيم Cytochrome Oxidease يؤدي إلى أكسدة مادة Cytochrome C والذي بدور يؤكسد 1% من مادة N, N, N, N tetramethyl-p-phenyldiamine dihydrochloride التي تستخدم ككاشف لهذا الاختبار .

الكاشف أعلاه عبارة عن صبغة وردية اللون (في حالة الاختزال) وتتأكسد لتعطي اللون البنفسجي في حالة التأكسد بوجود أنزيم Oxidase والأوكسجين .

لإجراء هذا الاختبار تنمى البكتريا على وسط صلب مثل Tryptic Soy Agar (TSA) لمدة 24 ساعة ثم تنقل مستعمرة واحدة على ورقة ترشيح مشبعة بمادة الكاشف بوساطة عيدان خشبية .الكشف الموجب هو تحول لون الورقة من الوردي الفاتح إلى غامق إلى اللون الأسود خلال (10-30) ثانية .

اختبار انتزاع مجموعة الامين من الحامض الاميني الفنيلا لنيين amination

وهو اختبار للتحري عن البكتريا المنتجة لانزيم ylalanine Deaminase الحامض الاميني Phenylalanine

أهمية الاختبار:

هناك 3 اجناس من الكتريا المنتجة لهذا الانزيم وهي Proteus, Morganella, Providencia
هذ الخاصية تستخدم لتسهيل تشخيص هذ الاجناس وتمييزها عن بقية اجناس البكتريا المعوية.

ميكانيكية الاختبار:

عند ازلة مجموعة الامين من الحامض الاميني Phenylaninie ينتج حامض Phenylaphyruvic Acid والامونيا .
الوسط المستخدم Phenylalnine agar

هو عبارة عن وسط صلب بشكل مائل حيث تلقح البكتريا بالتخطيط على السطح المائل ثم يحضن بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة.

اسم الكاشف 10%: Ferric Chloride

والذي يتكون من:

10 غم Ferric Chloride (anhydrous)

100 سم^3 Distilled water

-بعد فترة التحضين يتم الكشف بإضافة 5-10 قطرة على سطح المائل لتسريع التفاعل ممكن استخدام اللوب لمزج البكتريا مع المحلول.

-النتيجة الموجبة ظهور اللون الاخضر الداكن خلال 1-5 دقيقة .

النترات اختزال اختبار Nitrate Reduction Test

الغرض من هذا الاختبار هو للكشف عن قابلية البكتريا على اختزال النترات NO_3 إلى نتريت NO_2 والذي بدور يختزل إلى N_2 بواسطة بعض الانزيمات المعروفة Reductases.

بعض انواع البكتريا اللاهوائية الاختيارية Facultative Anaerobic تنتج انزيم يختزل (يضيف الكترون أو يزيل اوكسجين) من نترات بواسطة هذا الانزيم تستطيع البكتريا الاستعاضة بالنترات بدلا من الاوكسجين كمستلم نهائي للالكترونات في عملية التنفس.

$$NO3 + 2e + 2H \xrightarrow{\text{Nitrate reductase}} NO2 + H2O$$

وبذلك تستطيع العديد من البكتريا اللاهوائية الاختيارية استخدام النتروجين في النترات للتنفس اللاهوائي .إن معظم البكتريا المعوية تختزل النترات إلى نتريت، بينما بعض الانواع الاخرى مثل بعض انواع Pseudomonas تستطيع اكمال التفاعل إلى غاز النتروجين .

$$NO_2 + N_2 \longrightarrow NO_3$$

وهذه الانواع هي هوائية مجبرة الا انها تستطيع ان تقاوم الظروف اللاهوائية بالاستعانة بأيون NO_3 بدل من الاوكسجين كمستلم للالكترونات لتحرير الطاقة لعمليات البنائية 24 ساعة حضانة يضاف الكاشف:

1-كاشف Reagent A:

حامض السلفانيليك Sulfanilic Acid 1.6 غم

حامض الخليك Acetic acid 5 عياري 200سم^3

2- الكاشف Reagent B:

N, N- dimethyl - α – naphthylamine 1 غم

Acetic Acid 5m 5 عياري 200سم^3

يحضر حامض الخليك 5 عياري بإضافة جزء من حامض الخليك الثلجي إلى جزئين ونصف من الماء المقطر الكواشف A,B يمكن ان تحفظ بدرجة حرارة ° 22 م لمدة سنة .

طريقة اجراء الكشف:

الوسط المستخدم : Nitrate broth

24 بعد حضانة الوسط بدرجة حرارة 37 م لمدة 18 -24 ساعة يضاف 3 قطرات من كل A, B.

ويلاحظ تكون اللون الاحمر بعد الآضافة فهي نتيجة تعتبر موجبة نتيجة اختزال النترات

$$NO3 \longrightarrow NO2$$

اختبار انزيم اليوريز Urease enzyme

هو اختبار للتحري عن انزيم اليوريز الذي تنتجه بعض البكتريا مثل Klebsiella , Proteus وهو مهم في تشخيص هذين الجنسين وتميزها عن افراد البكتريا المعوية الاخرى وتنتج هذا الانزيم ايضا بكتريا *Helicobacter pylori*. حيث تستخدمه لمقاومة حموضة المعدة اذ يقوم هذا الانزيم بتكسير جزيئات اليوريا (الناتجة من عملية هدم البروتينات من قبل خلايا الجسم) وهي تتواجد بصورة طبيعية في عصارات المعدة وينتج عن تكسير اليوريا الى امونيا وCO_2 وبذلك تستطيع هذه البكتريا معادلة حموضة المعدة لتتمكن من النمو وإحداث الاصابة.

اسم الوسط Christensen's media الذي يحتوي على مستخلص الخميرة والاكار وكاشف الفينول الاحمر .بالإضافة الى مواد غذائية اخرى .يعقم هذا الوسط بالموصد بدرجة° 121 م لمدة 15 دقيقة .ثم يحضر محلول اليوريا المعقم الى الوسط السابق ثم يوزع على انابيب ويبرد بشكل مائل Slant
الكشف الموجب تحول لون السطح المائل من الاصفر الغامق الى اللون الوردي نتيجة لتفكك اليوريا لتعطي الامونيا وغاز ثاني اوكسيد الكاربون مما يؤدي الى ارتفاع PH .

الكشف عن انزيم الكاتاليز Catalase Test
يستخدم لتمييز العنقوديات Staphylococcus (وتعطي اختبار موجب) عن المسبحيات Streptococci والتي تعطي نتيجة سالبة له .ان انزيم Catalase يحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء وأوكسجين (غاز) حسب المعادلة التالية:

$$2H_2O \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2$$

وجود هذا الانزيم مهم جدا للنمو الهوائي لانه يمنع تراكم المواد السامة التي قد تقتل البكتريا.

طريقة الاختبار:
1-تنمى البكتريا على وسط مغذي صلب Nutrient Agar
2-ينقل جزء من هذا النمو بواسطة عيدان خشبية إلى شريحة زجاجية نظيفة.
3- تضاف قطرة من كاشف 3% H_2O_2 بيروكسيد الهيدروجين
الكشف الموجب :ظهور فقاعات نتيجة لتحرر غاز الاوكسجين .
ملاحظة :لا يمكن استخدام وسط اكار الدم في هذا الاختبار وذلك لان كريات الدم الحمر تحتوي على انزيم Catalase وبالتالي فقد تعطي اختبار موجب كاذب.

اختبار انزيم التجلط Coagulase test :
من اهم الاختبارات لتشخيص العنقوديات الذهبية كما ان coagulase لا يعتبر من ... البكتريا *Staphylococcus aureus* يتفاعل هذا البروتين مع مادة موجودة في ... هذا التفاعل يدعى staphylothrombin والذي يؤدي إلى تخثر الدم وذلك بتحويل الفايبرينوجين إلى فايبرين .
احيانا يرتبط هذا البروتين بشدة على سطح البكتريا ويغطي السطح بالليفن عند تماسه مع الدم .العنقوديات لمغلفة بالليفين عادة تكون مقاومة لعملية الالتهام Phagocytosis بشكل عام تمتلك العنقوديات الذهبية ما يسمى Clumping Factor ويطلق عليه احيانا "‘Slide Coagulase’" الذي يكشف عنه بملاحظة تكتل البكتريا عند اضافة قطرة من بلازما الدم على الشريحة ومزجها مع قطرة من معلق البكتيريا . ان تكتل الخلايا ينتج عن بروتين مثبت على الخلايا ويلتصق مع الفايبرينوجين في البلازما .هذا البروتين يعتبر من عوامل الضراوة لبكتريا *Staphylococcus aureus* بسب ارتباطه مع مولد الليفين والليفين الموجود في الجروح مما يساعد على تجمع البكتريا على الجروح.

طريقة اجراء الاختبار:
تؤخذ انبوبة معقمة، يوضع في الانبوبة 0.1 سم^3 من مزرعة سائل للعنقوديات الذهبية مع 0.5 سم^3 من بلازما دم الارنب او الانسان Citrated Human Or Rabbit Plasma .
توضع الانبوبة في حمام مائي بدرجة 37 م لمدة من 4 - 24ساعة تفحص خلال هذه الفترة إذا كان الكشف موجب تتخثر بلازما الدم، الكشف السالب عدم وجود تخثر الدم .

لتحضير البلازما:
1-يسحب دم من الارنب أو الانسان يوضع في انبوبة معقمة تحتوي على مادة مانعة لتخثر Anti-Coagulant مثل K-Oxalate or sodium citrate or heparin لكل 12 سم^3 من الدم يضاف1 سم^3 من 2% اوكزالات الصوديوم أو البوتاسيوم .
للتخلص من الكريات يرسب الدم بعملية الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة/دقيقة ، لمدة 15 دقيقة ستترسب عند هذه السرعة المكونات الخلوية ليبقى في الاعلى سائل اصفر رائق هو البلازما الحاوي على الفايبرينوجين .لتحضير المصل Serum يسحب الدم ويوضع في انبوبة عريضة معقمة وتترك الانبوبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة ليتخثر الدم

وبذلك نتخلص من الفايبرينوجين والمكونات الخلوية . بواسطة عيدان خشبية معقمة تفصل وبحذر شديد الخثرة عن جدار الانبوبة ليطفو سائل رائق عديم اللون إلى اعلى الانبوبة يدعى المصل.

د. صلاح ناجي عزيز