التعرف على الجراثيم

تقوم الجراثيم بكثير من الأفعال الاستقلابية الحيوية وذلك بمساعدة عدد من الأنزيمات النوعية الخاصة بالجراثيم، لذلك استخدمت الخصائص الاستقلابية واختلافها بحسب النوع الجرثومي للتفريق بين الأنواع الجرثومية المختلفة.

وبشكل عام عندما يحصل الفاحص على جميع الصفات المورفولوجية والخصائص الزرعية للعينات المرضية المدروسة، فهذا يقوده إلى وضع استنتاج مبدئي لتلك العينات، ولكن يجب الملاحظة بأن الصفات المورفولوجية والزرعية للعينات المدروسة يمكن أن تقودنا إلى معرفة الجنس الجرثومي فقط، أما من أجل المعرفة الدقيقة للنوع الجرثومي فيتوجب على الفاحص معرفة الصفات الفيزيولوجية أو الكيميائية الحيوية للجراثيم. لذلك فقد اعتمدت مجموعة من الصفات الكيميائية الحيوية لكل جرثوم أصبحت بمثابة الطابع المحدد لهوية هذا الجرثوم وهي:

1- الاختبارات االحيوية الكيميائية

1 - استهلاك السكاكر Carbohydrate fermentation tests

نحضر عدة أنابيب من وسط زرعي سائل (مرق اللحم Pepton Medium/Broth) ويضاف لكل أنبوب منها نوع واحد من السكاكر (غلوكوز،لاكتوز، سكاروز،.....الخ) مع مشعر لوني pH Indicator وهو أحمر الفينول Phenol red، كما يمكن أن نضع ضمن كل أنبوب من الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي السائل أنبوب صغير مقلوب بشكل الجرس يدعى أنبوب درهام Durham والذي سمي نسبة إلى الباحث الإنكليزي Herbert Edward Durhamعام 1866–1945، ثم نزرع الأنابيب بالجرثوم المراد دراسته، وبعدها تحضن هذه الأنابيب بدرجة حرارة مناسبة لنمو الجرثوم ولمدة 24–48 ساعة أو أكثر بالنسبة لبعض الجراثيم، فإذا كان الجرثوم من النوع الذي يخمر السكاكر مع انطلاق غاز فإن فقاعات الغاز المتحررة تحت الأنبوب الصغير سوف تتجمع بشكل فقاعة كبيرة ظاهرة للعين المجردة داخل الأنبوب الصغير وتحل محل الوسط

Dr Hiba Alhamed Alduhi

الزرعي السائل الذي كان يملأ الأنبوب الصغير. أما إذا كان الجرثوم يخمر السكر دون أن يطلق غاز فإننا لا نلاحظ أية فقاعات أو تغير في الأنبوب الصغير. كذلك ندرس تغير لون المشعر لتحديد فيما إذا تشكل حمض أم لا وهذا يوضح فيما إذا هذا الجرثوم قد خمر هذا النوع من السكاكر أم لا.

وعموماً فإنه من الملاحظ في حال قيام الجرثوم باستقلاب السكر الموجود في الوسط الزرعي، فهذا يؤدي إلى إنتاج حمض، والذي يعمل على خفض قيمة الـ pH في الوسط الزرعي، إما في حال عدم استقلاب السكر الموجود في الوسط من قبل الجرثوم المختبر فسوف تبقى درجة حموضة الوسط معتدلة pH Neutral. وكذلك في حال عدم استقلاب السكر الموجود في الوسط الزرعي السائل واستهلاك الببتون من قبل الجرثوم فهذا سوف يؤدي إلى إطلاق غاز الأمونيا ammonia كناتج عن عملية تهديم الببتون Peptone Degradation، وبالتالي سوف يؤدي إلى رفع درجة الـ pH.

قراءة النتائج :

نتيجة ايجابية: حمض (أصفر): يؤدي إنتاج الحمض في الوسط إلى تغير اللون من الأحمر إلى اللون الأصفر، وهذا يدل على أن الجرثوم قادر على تخمير السكر الموجود في الوسط الزرعي.

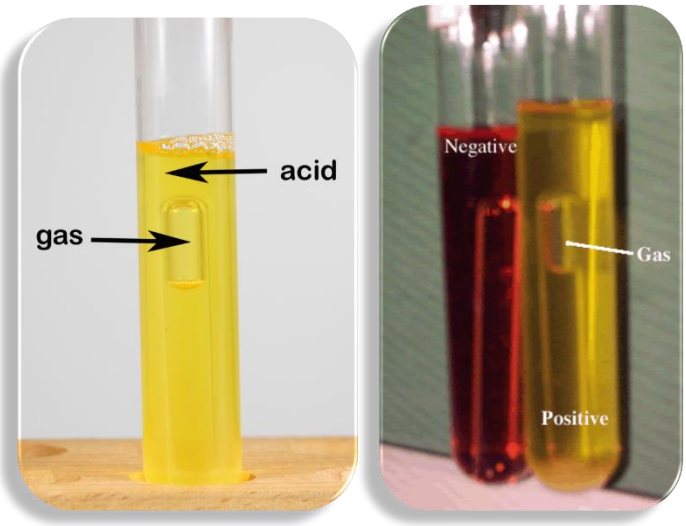
نتيجة إيجابية: حمض + غاز (أصفر + فقاعات غاز): هنا يتم الإشارة إلى عملية تخمر السكر بتغير اللون إلى اللون الأصفر وكذلك يتجمع الغاز الناتج في أعلى أنابيب درهام على شكل فقاعات هوائية حيث يحل الغاز محل الوسط الزرعي، تجمع هذه الفقاعات الهوائية دليل على إطلاق غاز.

نتيجة سلبية: تتجلى عملية التخمر السلبية بمظهرين مهمين:

عدم تغير اللون في الوسط الزرعي دليل على عدم قدرة الجرثوم على استهلاك السكر الموجود في الوسط.

تغير اللون من الأحمر إلى اللون الزهري المحمر الغامق دليل على إنتاج بعض المواد القلوية كمنتجات نهائية عن عمليات تهديم واستهلاك الببتون الموجود في الوسط الزرعي.

Dr. Hiba Ahamed Albuihi



2- إماهة النشاء Starch Hydrolysis Test

يتم الكشف عن أنزيم الأميلاز كما يلي:

يضاف إلى الآغار المغذي Nutrient Agar النشاء بتركيز 10 غ/ل ثم يعقم الوسط ويسكب في علب بتري معقمة ويزرع الجرثوم بطريقة الوخز أو اللطاخات، وبعد الحضن لمدة 3-4 أيام بدرجة الحرارة المناسبة لنمو الجرثوم يلاحظ تشكل منطقة نيرة حول منطقة الوخز أو حول اللطاخة فهذا دليل على استهلاك الجرثوم للنشاء، كذلك يمكن التأكد من ذلك بإضافة عدة قطرات من محلول لوغول Iodine على سطح علبة البتري فالمناطق الحاوية على النشاء تتلون باللون الأزرق أما المناطق الخالية منه فتبقى عديمة اللون .

iba Alhamed AlDulhi

وسط الآغار مع النشاء بعد إضافة الأيودين

وسط الآغار مع النشاء قبل إضافة الأيودين

3- دراسة الأنزيمات التنفسية

هذه الأنزيمات قادرة على تفعيل الأوكسجين الغازي لنقل إلكترونين وإنتاج H_2O_2، أو تثبيت الأوكسجين على الركيزة (Substrate).

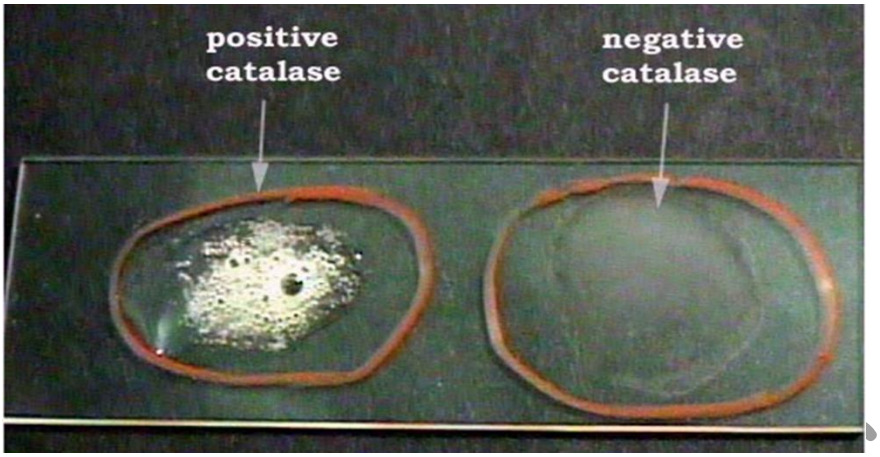
♦ البحث عن الأوكسيداز Oxidase Test:

يتم هذا الاختبار بتشريب ورقة نشاف Whatman I بقطرة أو قطرتين من محلول مائي عديم اللون 1% لكلورهيدرات أو أوكسالات الـ Dimethyl para phenylene diamine، ثم بعد ذلك تؤخذ مستعمرة جرثومية من مزرعة عمرها 18-24 ساعة وتوضع على ورقة النشاف المبللة بالمادة المذكورة سابقاً فإذا أعطت لون زهري في الحال وبسرعة يتحول إلى بنفسجي ومن ثم إلى بني ثم اسود فنقول عندئذ أن الجرثوم يمتلك إنزيم الأوكسيداز، أو موجب الأوكسيداز، وإذا لم يحدث أي تلون أو أن التلون بطيء جداً فهذا يعني أن الجرثوم لا يحتوي على أنزيم الأوكسيداز فهو سالب الأوكسيداز.

♦البحث عن أنزيم الكاتالاز Catalase Test :

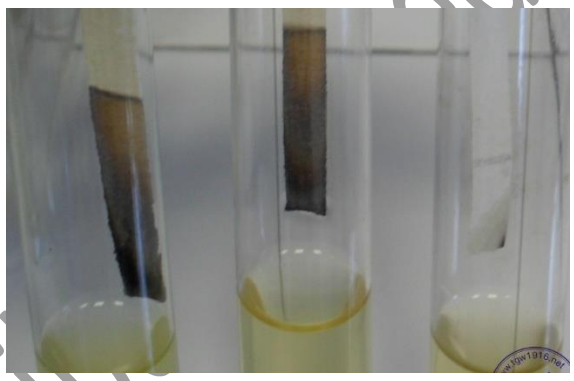
وللكشف عن هذا الأنزيم نتبع مايلي:

نضع على شريحة زجاجية قطرة من الماء الأوكسيجيني 3% hydrogen peroxide، ثم نأخذ مستعمرة جرثومية ونضعها في قطرة الماء الأوكسيجيني، أو أن نضيف 1 مل من الماء الأوكسيجيني على مزرعة جرثومية عمرها 24 ساعة في وسط مغذي سائل فإن حدوث فوران أو انطلاق فقاعات غازية (انطلاق الأوكسيجين) يعني أن الجرثوم يمتلك أنزيم الكتلاز، وإن لم يحصل فوران فهذا يعني أن الجرثوم لايمتلك هذا الأنزيم . وعند اختبار الكتلاز يجب أخذ الحذر وذلك عند أخذ جرثوم مزروع على وسط آغار بالدم حيث أنه يجب أخذ الجرثوم فقط دون أخذ أي جزء من وسط الزرع لأن خلايا الدم تحتوي على أنزيم الكتلاز وبالتالي يعطي نتيجة خاطئة.



4- إطلاق غاز كبريت الهيدروجين

يجرى هذا الاختبار بوضع شريط من ورق النشاف المشبع بتحت خلات الرصاص في أعلى أنبوب اختبار من المرق المغذي المزروع بالجرثوم، ففي حال إطلاق الجرثوم لغاز كبريت الهيدروجين فإن هذا الشريط سوف يتلون باللون الأسود نتيجة لتشكل كبريتات الرصاص، أما في حال عدم إطلاق الجرثوم لهذا الغاز فيبقى لون الشريط على حاله.

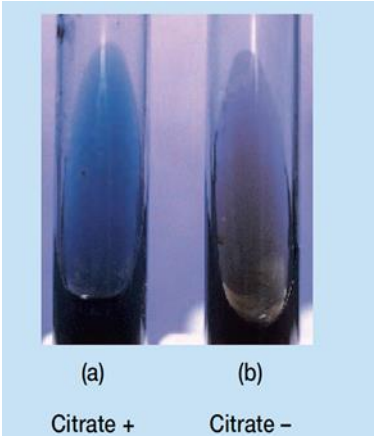


5 – استعمال السيترات كمصدر للكربون Citrate Utilization

تستطيع بعض الأنواع الجرثومية النمو على وسط زرعي سيمون سيترات Simon citrate مستخدمة سيترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون، فالجراثيم التي يمكن أن تفكك السيترات هي وحدها التي يمكن أن تأخذ الكربون منها وبالتالي يمكن أن تنمو على هذا الوسط.

يزرع هذا الوسط اعتباراً من مزروع الجرثوم المعزول على وسط مائل وليس من مزروعة على المرق أو الماء الببتوني وذلك لاحتوائهم على بعض المواد الغذائية التي يمكن أن تغير النتائج. وبعد زرع الوسط يحضن بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة، فالجراثيم التي تستعمل السيترات تنمو على هذا الوسط وبالتالي يتم إفراز القلويات كمنتجات نهائية Alkaline Products

وبالتالي يتحول درجة الحموضة من الوسط المعتدل 6.8 إلى الوسط القلوي حوالي pH 7.6<وبالتالي يتحول الون بوجود مشعر أزرق البروموتيمول من الأخضر إلى الأزرق، أما الجراثيم التي لا تستطيع استعمال السيترات فإنها لا تنمو على هذا الوسط وبالتالي يبقى لونه أخضر.



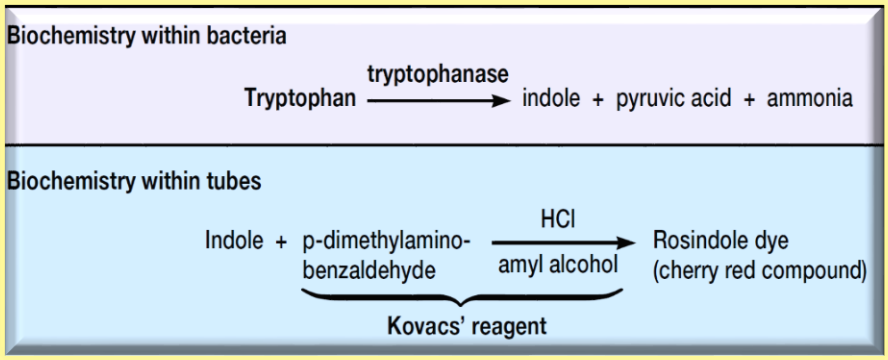
6- اختبار تحرر الإندول Indole Test

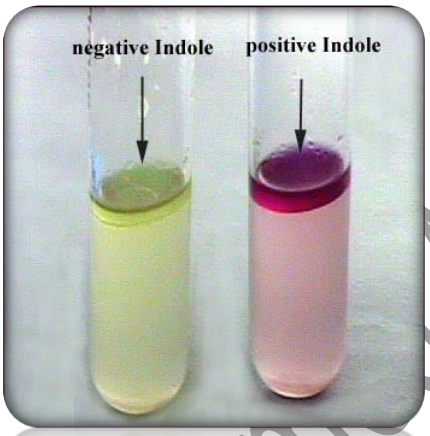
يجري التحري عن الأندول في الماء الببتوني المضاف إليه التريبتوفان أو ما يسمى بوسط Tryptophan broth (1% tryptophan) (حيث تتمكن بعض الجراثيم من تحطيم التريبتوفان عند زرعها وتحررالأندول) المزروع بالجرثوم وبعد 24 ساعة من الحضن بدرجة 37 مئوية، تضاف عدة قطرات حوالي 15 قطرة 15 drops من كاشف ايرليخ- كوفاكس Ehrlich- Kovac's على سطح مزروع الجرثوم في الوسط السابق فنحصل على حلقة حمراء دالة على تحرر الأندول.

ويحضر كاشف ايرليخ- كوفاكس Ehrlich- Kovac's كما يلي:

تحل 5غ من بارا دي ميتيل أمينو بنز الدهيد Para Dimethylaminobenzaldehyde في 75 مل من الكحول الأميلي Amylic Alcool ثم نضيف إليها 25 مل من حمض كلور الماء المركز.

Dr. Hiba Ahamed AlDuihi





7- البحث عن الأسيتوئين (تفاعل فوغس- بروسكاوير Voges-Proskauer)

ويتم البحث عنها باستعمال وسط كلارك- لوبس Clark- Lubs أو وسط MR/VP broth الذي يتركب من المواد التالية:

Ingredients	Grams / litre
Pepton	7.0
Glucose (Dextrose)	5.0
Disodium Phosphate	5.0
Distilled Water	1000 ml

تضبط درجة الـ pH على 6.9 ويوزع في أنابيب ويعقم بالصاد الموصد بدرجة 121 مئوية لمدة 20 دقيقة ثم يزرع بالجرثوم المراد دراسته ويحضن لمدة 48 ساعة بدرجة 37 مئوية.

ثم يكشف عن وجود مادة الأسيتوئين كما يلي :

Dr Hiba Alhamda AlDuihi

يؤخذ 1 مل من وسط كلارك– لوبس المزروع بالجرثوم و يضاف إليه

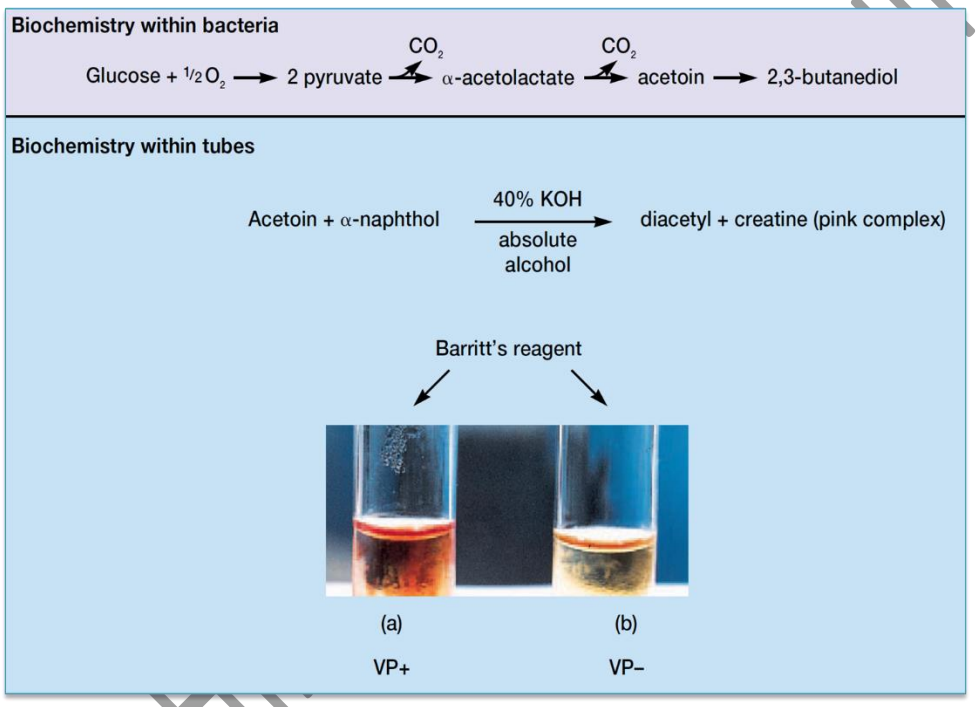
0.5 مل من محلول **Barritt's Reagent A**

(alpha-napthol) الفا نافتول (6% في الكحول 60°)

ثم 1 مل من **Barritt's Reagent B**

(potassium hydroxide) محلول الصود الكاوي (16% في الماء المقطر)،

نحرك الأنبوب جيداً ونتركه لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة المخبر، إن ظهور لون زهري أو أحمر في الجزء العلوي أو في أرجاء الأنبوب دليل على إنتاج الجرثوم للأستوئين.

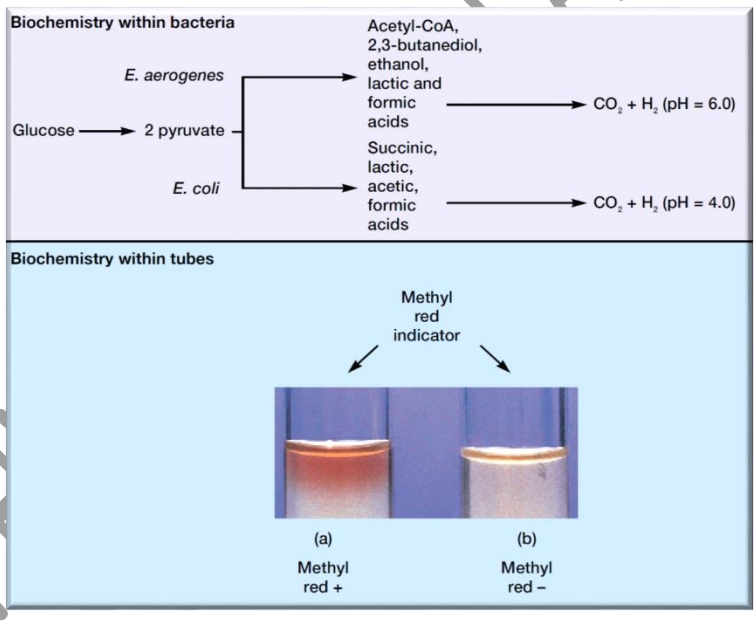


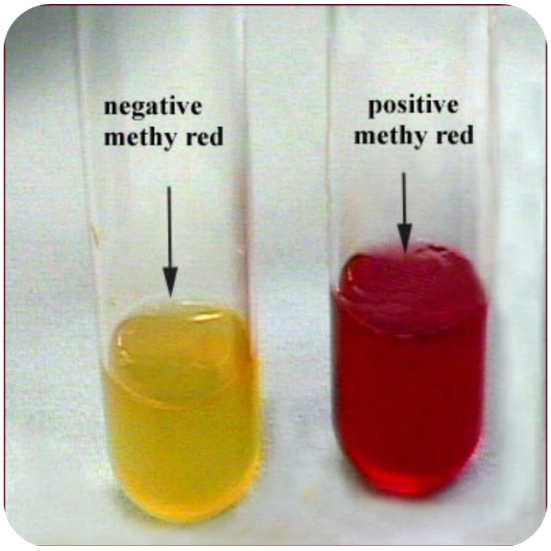
8- تفاعل حمرة الميتيل Methyl Red Test

يزرع الجرثوم المراد دراسته على وسط كلارك- لوبس Clark- Lubs أو وسطMR/VP broth ويحضن بدرجة 30 أو 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة

ثم يؤخذ 1-2 مل من مزروع الجرثوم وتضاف إليه قطرتين من محلول أحمر الميتيل Methyl Red (0.5% في الكحول 60°)،

إن إعطاء لون أحمر دليل على أن الوسط أصبح حمضياً بقيمة pH أقل من 4.4 نتيجة لتفكك الغلوكوز وبذلك يعتبر التفاعل إيجابي، أما بقاء الوسط قلوياً (pH greater than 6.0) وبلون أصفر دليل على أن التفاعل سلبي، أما ظهور اللون البرتقالي فهذا دليل على أن درجة الحموضة هي بين الدرجتين السابقتين وبالتالي الأنبوب يحتاج إلى تحضين لزمن أطول





9 - إرجاع النترات إلى نتريت Nitrate Reduction Test

وتتم دراسة ذلك على وسط النترات Nitrate Medium والحاوي على المواد التالية:

Ingredients	Grams / litre
potassium nitrate	1.0
Distilled Water + Nutrient Broth / Agar to	1000 ml

تحل المواد ثم تضبط درجة الـpH على 7-7.2 ثم يوزع في أنابيب بمقدار 5 مل/ أنبوب وتعقم بالصاد الموصد بدرجة 120 مئوية لمدة 20 دقيقة بعدئذ تترك لتبرد بوضع مائل إذا كانت المزرعة صلبة.

تزرع الأنابيب بالجرثوم المراد دراسته وتحضن بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة ثم يوضع على سطح المزروع 3-4 قطرات من المحلول الأول sulfanilic acid والمؤلف من

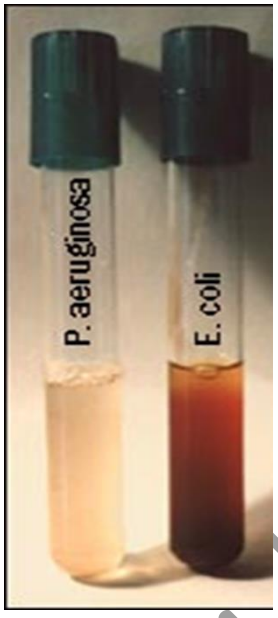
حمض السلفانيليك	٨ غ
محلول حمض الخل N٥	١٠٠٠ مل

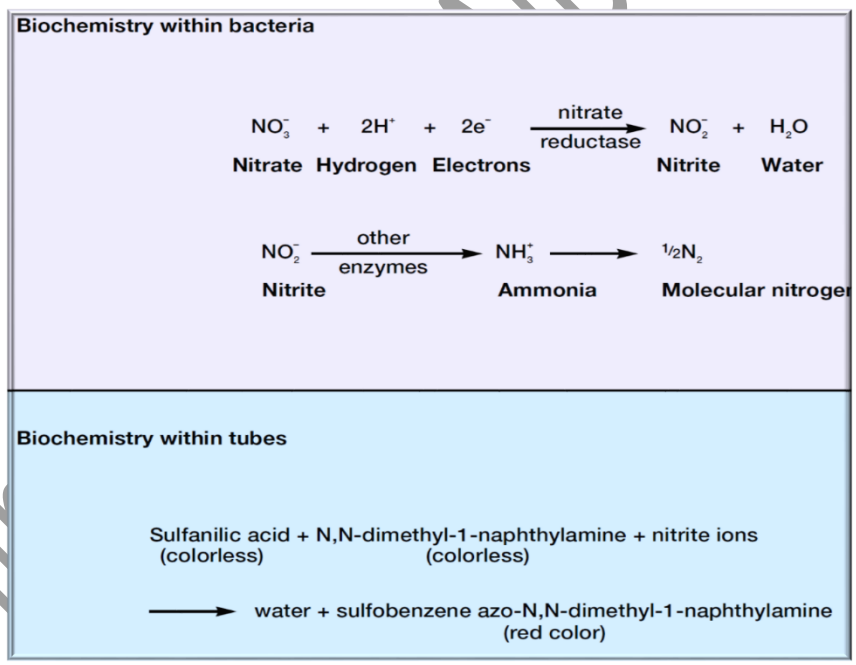
ثم 3-4 قطرات من المحلول الثاني α-naphthylamine والمؤلف من:

الفا نافتيل أمين Alpha naphtylamine	٥ غ
محلول حمض الخل N٥	١٠٠٠ مل

إن ظهور لون أحمر دليل على تحول النترات إلى نتريت ، وفي حالة الشك (لون زهري) نقوم بوضع قطرات من المحلول الأول والمحلول الثاني على أنبوب يحوي على وسط غير مزروع.

هناك بعض الجراثيم تستطيع خلال 24 ساعة أن تتعدى مرحلة النتريت، لذلك يجب البحث عن ذلك مبكراً خلال 10–12 ساعة .





Dr. Hi

10- إماهة البولة (انتاج أنزيم اليورياز)

نستخدم من أجل ذلك وسط كريستنسن Christensen الذي تركيبه كالتالي :

ببتون تربسيني	1 غ
كلوريد الصوديوم	5 غ
فوسفات احادية البوتاسيوم	2 غ
آغار	20 غ
ماء مقطر	1000 مل

تحل هذه المركبات ثم نضيف 1 غ من الغلوكوز و 3 مل من محلول أحمر الفينول (0.4%). تضبط درجة الـ pH على 6.8-7 ويوزع في أنابيب بمقدار 5 مل /أنبوب، تعقم في الصاد الموصد لمدة 15 دقيقة بدرجة 120 مئوية وبعد إخراجها من الصاد الموصد تترك لتبرد حتى درجة 50-55 مئوية ثم يضاف إلى كل أنبوب 0.5 مل من محلول البولة (20% في الماء المقطر) المعقم بطريقة الترشيح ثم تترك ليبرد الوسط بوضع مائل.

يزرع هذا الوسط على القسم المائل بالجرثوم المراد دراسته انطلاقاً من مستعمرات على وسط صلب، ثم تحضن الأنابيب بدرجة 30 أو 37 مئوية لمدة 1-6 أيام، إن تحول لون الوسط من الأصفر إلى الزهري ثم الأحمر دليل على تفكيك الجرثوم للبولة وتحويلها إلى نشادر وذلك بإفرازه لأنزيم اليورياز

a b

إماهة البولة (انتاج أنزيم اليورياز)

a - وسط غير مزروع

b - نتيجة إيجابية *Proteus*