الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة الحادية عشر

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

دراسة أهم الجراثيم والعوامل المؤثرة في نموها

Study the important bacteria and factors affecting its growth

أولاً– دراسة أهم الجراثيم الممرضة:

تأخذ الجراثيم الممرضة ما تحتاجه لنموها وتكاثرها من العضوية التي تعيش عليها مع إحداث تأثيرات ضارة مختلفة على هذه العضوية مما يسبب الأذية وإحداث المرض عندما تعجز دفاعات الجسم عن صدها. يحدث المرض عندما تنمو الجراثيم على حساب أنسجة العضوية أو عندما تفرز ذيفاناً خارجياً أو داخلياً.

- هناك جراثيم ممرضة نوعية (محددة من الناحية السريرية والفيزيولوجية) مثل الحمى التيفية، وجراثيم ممرضة غير نوعية مثل العنقوديات (تختلف أعراض امراضيتها حسب مكان الإصابة).
- هناك جراثيم إجبارية الامراضية مثل السالمونيلا، لا تستطيع التكاثر خارج بؤرة الخمج وليس لها حَمَلة أصحاء، ووجودها يعني وجود المرض. وجراثيم مخيرة الامراضية تعيش على العضوية دون إحداث المرض ولكن بظروف معينة تحدث المرض.

- **تشخيص الجراثيم الممرضة:**

يتم التشخيص وفق طريقتين:

1– طريقة مباشرة: يتم فيها عزل الجراثيم أو أحد مكوناتها ثم التعرف عليها بطرق مختلفة منها:

- الفحص المجهري.
- الزرع والعزل.
- دراسة الصفات الحيوية الفيزيائية والصفات الحيوية الكيميائية.
- استخدام التقانات البيولوجية الجزيئية لتحديد DNA.

2– طريقة غير مباشرة: تعتمد على البحث عن أضداد الجراثيم، أي الكشف عن الاستجابة المناعية التي قام بهاالجسم تجاه الجراثيم، ولها طرق كثيرة.

- **المكورات ايجابية غرام:**

سندرس منها جنس العنقوديات *Staphylococcus*

نوع العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*

من فصيلة المكيرات *Micrococcaceae*

تعتبر العنقوديات من الجراثيم الممرضة اللانوعية، وهذا النوع مسؤول عن العديد من الأخماج خاصة عند اضطراب المناعة أو عند حدوث أذية في النسج مثل الرض، الجرح، الحرق. تسبب العنقوديات الدمامل، الداحس، الخراجات، خمج الدم، التهاب العظام والنقي، كما تسبب بعض التسممات الغذائية.

- خصائصها الحيوية الفيزيائية:

واسعة الانتشار لأنها مقاومة للجفاف والملوحة (تشاهد عند 30 – 40 % من الأفراد الأصحاء الذين يحملون العنقوديات الذهبية على الجلد وفي الأنف). هي مكورات ايجابية غرام قطرها حوالي / 1 / ميكرون تجتمع بشكل عنقودي يصل عدد المكورات في العنقود إلى / 50 / مكورة، وهي هوائية اختيارية تنمو بسهولة على المستنبتات الزراعية، وتشكل صباغ أصفر يميزها بعد 24 – 36 ساعة من استنباتها، تعكر المرق المغذي بشكل متجانس.

- خصائصها الحيوية الكيميائية:

نستطيع بتلك الخصائص أن نميزها عن أنواع .Staph غير الممرضة، من أهم هذه الصفات:

- تمييع الجيلاتين، وتنمو على وسط شابمان وهو وسط ذو تركيز ملحي عالي (7 – 10 % NaCl) مع المانيتول وحمرة الفينول، وتقلب لونه من الأحمر إلى الأصفر لأنها تخمر سكر المانيتول.
- تنتج أنزيم المختراز Co agulase، وأنزيم الفوسفاتاز Phosphatase .
- تنتج خميرة ديزوكسي ريبونكلياز Desoxy ribonuclease الحالة للحمض النووي DNA.

الشكل (27): الجراثيم من نوع العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*

- **العصيات سالبة غرام:**

فصيلة العصيات المعوية (الأمعائيات) Enterobacteriaceae

هي فصيلة تضم حوالي /100/ جنس منها /25/ جنس ممرض للإنسان. يُعزى سبب تسمية هذه الفصيلة بالأمعائيات إلى أنها تعيش في أمعاء الإنسان والحيوان بشكل طبيعي أو تكون ممرضة، وينجم وجود بعض الأنواع في الوسط الخارجي عن التلوث بالبراز ولهذا شأن كبير في مجال الصحة العامة والصحة الغذائية. تنتمي أفراد هذه الفصيلة إلى مجموعة العصيات اللاهوائية الاختيارية السالبة لغرام حسب دليل بيرجي Bergeyes Manual منها الأجناس التالية:

Shigella (الشيغلات)، *Escherichia* (الإشريكيات)، *Salmonela* (السلمونيلات)، *Klebsieilla* (الكليبسلات)، *Yersineae* (اليرسينيات) وغيرها، وتحتوي هذه الفصيلة على جراثيم رمية تعيش في التربة وعلى أسطح النباتات أي أنّ مصدرها غير برازي منها الأجناس التالية: *Erwinia* (الأورينيات)، *Proteus* (المتقلبات)، و*Enterobacter*.

تشترك أفراد هذه الفصيلة بالعديد من الصفات منها:

1- هوائية مخيرة.

2- عصوية الشكل سالبة غرام غير متبوغة.

3- بعضها متحرك بسياط وبعضها يحوي محفظة.

4- تنمو على الأوساط العادية فهي سهلة الزرع والاستنبات لعدم حاجتها لعوامل نمو.

5- تخمر سكر الغلوكوز مع أو بدون إطلاق غاز.

6- ترجع النترات إلى نتريت.

7- لا تحتوي على خميرة الأوكسيداز.

8- تسكن الأمعاء فهي مقاومة لأملاح الصفراء، وتوجد في الماء والتراب نتيجة التلوث.

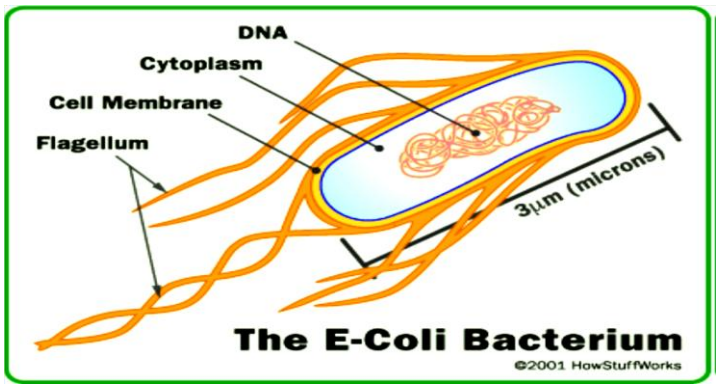
9- منها اجبارية الامراضية ومنها انتهازية ومنها الممرضة النوعية وغير النوعية.

سندرس منها جنسين هما: *Escherichia* و *Salmonella*.

- ***Escherichia*:**

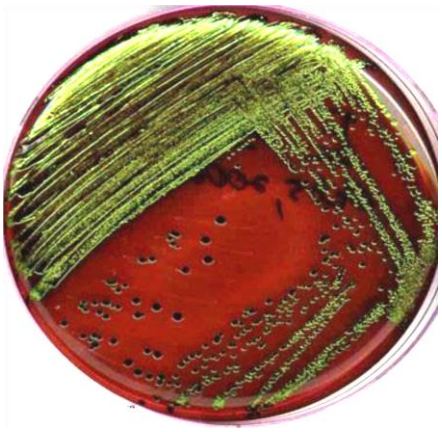
نوع الاشريكية القولونية *E.coli*: تنتمي جراثيم *E. coli* إلى مجموعة جراثيم القولون Coliform وتتصف أفرادها بأنها عصوية قصيرة، سالبة لصبغة غرام، غير متبوغة، متحركة، اختيارية للهواء، تحلل سكر اللاكتوز وتنتج حمض وغاز. يسكن هذا النوع في الأمعاء مشكلاً 80 % من الجراثيم الهوائية فيه،

وهو جزء من الفلورا الطبيعية في القولون، كما يوجد في مخاطيات الانسان. يوجد منه حوالي 170 نوع منها 20 نوع فقط قادر على إحداث المرض، وتكون مسؤولة عن الإنتانات البولية والتناسلية والهضمية والتهاب الطرق الصفراوية والتهاب الأمعاء واسهال المسافرين، وبنسبة أقل خمج الدم والتهاب السحايا خاصة عند الأطفال. يُعدّ وجود ميكروب *E. coli* في ماء الشرب دليل حيوي Bioindicator على تلوث الماء بمياه المجاري إذ تعتبر هذه الميكروبات كاشفات للتلوث ويعني هذا احتمال وجود ميكروبات مرضية معوية مثل التيفوئيد، والكوليرا، والدوسنتاريا، والفيروسات المعوية، ويدل عدد هذه الجراثيم على مدى تلوث المياه بالبراز ويحدد صلاحية الماء للشرب.



الشكل (28): النوع *Escherichia coli*

- **خصائصها:** عصيات بطول 1 – 3 ميكرون وعرض 0.5 ميكرون مدورة النهاية، وغير متبوغة لا تحوي محفظة منها متحرك (75%) بفضل سياط محيطية، وتكون مفردة أو مزدوجة وأحياناً سلسلية وهي سالبة غرام ذات تلون قطبي.
- **صفاتها الحيوية الفيزيائية:** حساسة للحرارة تموت خلال ساعة بدرجة 56 °م، وحساسة للكلور، وتقاوم حمض الفينيك 1 %، وتتميز بنموها على وسط EMB بلمعة معدنية فريدة.
- **صفاتها الحيوية الكيميائية:**



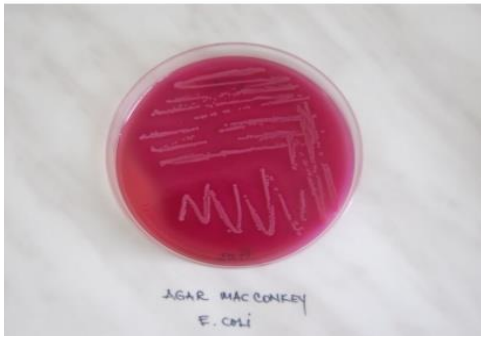
- تخمر الغلوكوز مع انطلاق غاز.
- تخمر اللاكتوز مع انطلاق غاز بسرعة (خلال 24 ساعة).
- تحرر الإندول.
- لاتميع الجيلاتين.
- لا تطلق غاز H_2S.
- لا تفكك البولة.
- سالبة فوكس بروسكاوير وايجابية حمرة الميتيل.

الشكل (29): جراثيم النوع *Escherichia coli*

- **أوساط التعرف على *E. coli*:** يوجد أوساط متعددة منها وسط ماكونكي Mac Conkey، ووسط هيكتون آغار Hektoen Agar، ووسط Violet-Red-Bile V.R.B، ووسط آغار ايوزين زرقة الميتلين Eosine-Methylene bleu (E.M.B) وهو من أهم الأوساط وأكثرها استخداماً من الأوساط الاصطفائية يحتوي على اللاكتوز والسكروز ومشعر لوني بالاضافة للإيوزين وأزرق الميتلين والأملاح الصفراوية. تنمو عليه جميع أفراد Enterobacteriaceae، ولكن تظهر *E.coli* بشكل مستعمرات بنفسجية مائلة للسواد ذات لمعة يودية.
- على المرق المغذي: تعكره بشكل متجانس مع ظهور لمعة حريرية عند خض الأنبوب مع وجود راسب رمادي اللون، وانطلاق رائحة برازية.
- على الآغار المغذي: مستعمرات مدورة منتفخة قليلاً ذات لون أبيض رمادي يبلغ قطرها 2 ملم لها رائحة برازية، ملساء من النمط S وأحياناً خشنة من النمط R.

E.coli on Hektoen agar: yellow-orange colonies (lactose acidification)

E.coli colonies on MacConkey: lactose positive (red) colonies



- ***Salmonella*:**

منها نوعين مهمين هما: *Salmonella typhi* الحمى التيفية

Salmonella paratyphi الحمى نظيرة التيفية.

عصيات إجبارية الإمراض لا توجد بشكل مطاعم إلا في حالات النقاهة تسبب مرض الحمى التيفية، والتسممات الغذائية. تنتشر في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان ويمكن أن توجد في البيئة بسبب التلوث لكنها لا تستطيع التكاثر رغم أنها تقاوم وتحافظ على بقائها في التربة لعدة أسابيع وأحياناً لعدة شهور إذا كانت الحرارة والرطوبة مناسبة.

- **صفاتها:** عصيات مستقيمة طولها حوالي / 3 / ميكرون، وعرضها / 0.5 / ميكرون عديمة المحفظة متحركة بسياط محيطية، وتكون مفردة أو مزدوجة أو متكتلة، وهي سالبة غرام، وهوائية مخيرة.

- **الخصائص الحيوية الفيزيائية:**

تتأثر بالحرارة (تموت خلال ساعة بالحرارة 56 °م)، وتتأثر بالمطهرات لكنها تقاوم البرودة والتجمد، وتقاوم بعض الملونات، وتقاوم أملاح الصفراء وسترات البزموت وسيلينيت الصوديوم.

- **الخصائص الحيوية الكيميائية:**

أهم صفة من صفاتها أنها لا تخمر سكر اللاكتوز وتنتج غاز H_2S، كما أنها لا تحرر الإندول، ولا تميع الهلام ولا تفكك البولة، وتخمر الغلوكوز مع اطلاق غاز وتخمر المانيتول، وتفاعل حمرة الميتيل ايجابي وفوكس بروسكاوير سلبي.

- **عزلها والتعرف عليها:** تعزل على وسط سائل هو سيلينيت الصوديوم بغية اكثارها وعزلها عن باقي المعويات وذلك خلال / 18 / ساعة بعد الزرع حتماً (الشكل 30). يتم التعرف عليها وعزلها ثانية على وسط S.S وهو وسط خاص (اصطفائي) للسالمونيللا والشيغيللا Salmonella – Shigella يحوي على اللاكتوز وأملاح الصفراء وسيترات الحديد والخضرة اللامعة. الجراثيم غير مخمرة للاكتوز (مثل السالمونيللا والشيغيللا) تنمو على هذا الوسط على شكل مستعمرات شفافة، أما المستعمرات المخمرة فتكون وردية اللون. جراثيم *Salmonella* منتجة لغاز H_2S تظهر لون أسود في مركز المستعمرة أما الشيغيللا *Shigella* فلا تعطي اللون الأسود لأنها لاتطلق غاز H_2S.

- **تفاعل فيدال Widal Test:**

اختبار مصلي هام يستخدم لتحديد الإصابة بالسلمونيلا وعيار الأضداد في مصل المريض يعتمد على التراص وهو اتحاد الضد في مصل المريض مع المستضدات الموجودة في الكاشف الخاص

بالسلمونيلا، حيث ترتفع الأضداد بشكل حاد خلال الأسبوعين الثاني والثالث من خمج السلمونيلا، يجب على الأقل معايرة عينتين مصليتين بفارق 7 – 10 أيام لإثبات وتشخيص الارتفاع في الأضداد.

الشكل (30): جراثيم *Salmonella*

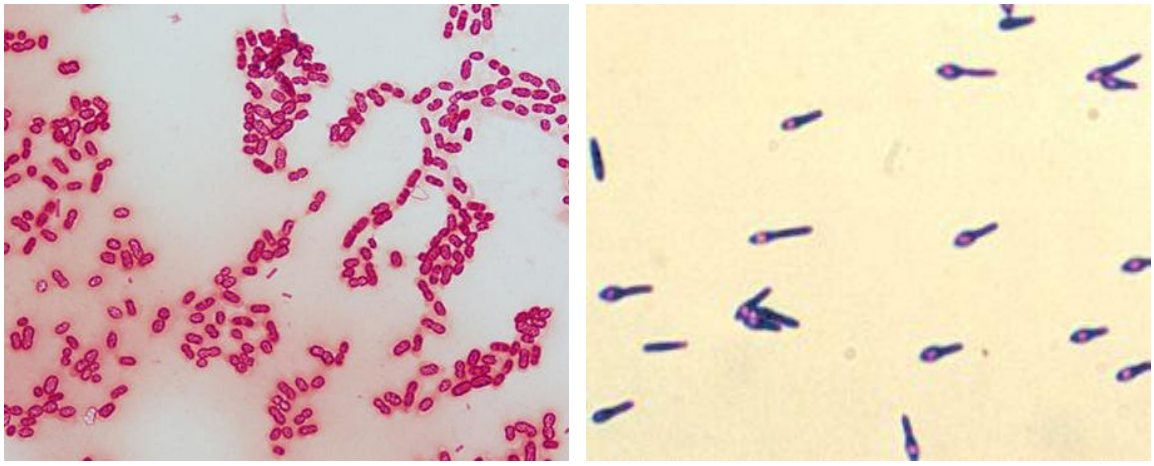
ثانياً– دراسة الجراثيم المثبتة للآزوت الجوي:

تتأكسد الأملاح النشادرية في التربة متحولة لأملاح الآزوت ويسمى هذا التحول بالتأزت وتقوم به عدة أجناس من الجراثيم.

1– جراثيم التثبيت اللاتعايشي Non symbiotic Nitrogen fixing:

جراثيم التعايش التآلفي Associative symbiotic، وتُعد المطثيات *Clostridium* من الجراثيم اللاهوائية التي تنمو في بيئة معدنية خالية من أملاح الآزوت، وتُعد الآزوتوباكتر *Azotobacter* من الجراثيم المهمة التي تقوم بتثبيت الآزوت الجوي هوائياً والتي يسهل عزلها من التربة، وهي هوائية إجبارية تنمو في بيئة خالية من الآزوت وتستمد الكربون من السكاكر المختلفة والنشاء والكحولات والأحماض العضوية، وتحتاج بعض العناصر المعدنية مثل الفوسفور. خلاياها كبيرة الحجم نسبياً، عصوية أو بيضوية، محاطة بمحفظة وهي سالبة غرام (الشكل 31).

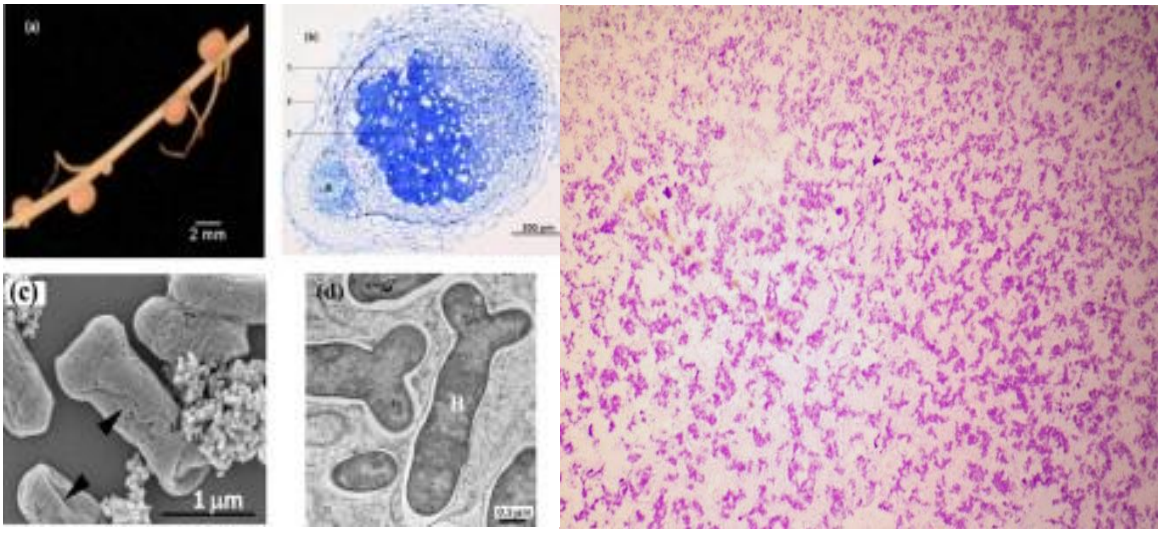
عزلها: يعتمد عزلها على تلقيح معلق التربة لأوساط غذائية سائلة أو صلبة خالية من الآزوت وهي أوساط تركيبية صنعية. تنمو على الأوساط السائلة على شكل غشاء رقيق وشفاف مائل للون الأصفر، أما على الأوساط الصلبة فتنمو على شكل مستعمرات بيضاء مخاطية لزجة.



الشكل (31): جراثيم المطثيات *Clostridium* (يمين)، وجراثيم الآزوتوباكتر *Azotobacter* (يسار)

2– جراثيم التثبيت التعايشي Symbiotic Nitrogen fixing Bacteria:

التعايش الإجباري Obligatory Symbiosis، ويعد الجنس *Rhizobium* مثالاً نموذجياً لهذه الجراثيم لأنه يمتلك القدرة على إصابة جذور النباتات البقولية والعيش داخل العقد الجذرية التي يشكلها بشكل يحقق تبادل منفعة بينه وبين النبات فهو يمنح النبات الآزوت الجوي المثبت ويأخذ بالمقابل المواد الغذائية اللازمة له. تتميز الجراثيم الموجودة داخل العقد حديثة السن بأنها عصوية الشكل (الشكل 32)، بينما تأخذ الأشكال X ، L ، Y ، T في العقد المسنة، ولذلك تسمى بأشباه الجراثيم Bacteroid، أما عند نموها على الأوساط الغذائية المصنعة فإنها تصبح ذات شكل عصوي قصير، وهي غير متبوغة سالبة غرام.



الشكل (32): جراثيم *Rhizobium* وأشكالها في العقد المسنة Bacteroid

- جراثيم النشدرة والنترجة:

تفرز بعض الجراثيم من جنس *Clostridium* أو أنواع من *Actinomyces* أنزيمات بروتيناز خارجية تعمل على تفكيك البروتينات وتحويلها إلى ببتيدات تتحلل بدورها بأنزيمات الببتيداز التي تفرزها جراثيم أخرى مثل *B. pyocyanic* إلى حموض أمينية تتحلل بدورها إلى نشادر ومواد أخرى بوساطة بعض الجراثيم من نوع المتقلبات *Proteus* أو*Micrococcus*، وتستطيع بعض الجراثيم من جنس *Nitrosomonas* أن تؤكسد النشادر الناتج محولة إياه إلى نتريت، ثم تؤكسد جراثيم *Nitrobacter* النتريت محولة إياه إلى نترات، ويتم الكشف عن هذه الجراثيم بتلقيح وسط مناسب مثل مرق البيتون والفوسفات بعينات من تربة خصبة.

ثالثاً- تأثير المواد المضادة للجراثيم Antibiotics:

المضادات الحيوية أو الصادات Antibiotics هي مجموعة من المركبات الكيميائية القادرة على القضاء على الجراثيم بإيقاف تكاثرها ونموها أو قتلها سواء التي تفرزها الكائنات الحية الدقيقة أو التي نصنعها كيميائياً. إن المطهرات والمضادات الحيوية تؤثر في النمو الجرثومي، وتستخدم عادة للقضاء على الجراثيم، ويختلف هذا التأثير باختلاف الجراثيم من ناحية واختلاف المادة المستخدمة من ناحية أخرى، وقد يكون هذا التأثير مثبطاً للنمو Bacteriostatic مثال بعض الأصبغة، أو قاتلاً للجراثيم Bactericidal مثال الهالوجينات ومشتقاتها، والحقيقة إن التمييز بين الحالتين ليس سهلاً بسبب تداخلها أحياناً، والمهم بالأمر أن بعضاً من هذه المواد له تأثير نوعي على بعض الجراثيم، ويمكن الاستفادة من هذه الخاصة بإضافتها للمستنبتات الجرثومية لعزل بعض الجراثيم التي لا تتأثر بها، وهذا هو مبدأ المستنبتات الاصطفائية مثال المستنبت المضاف إليه البنسلين لعزل الأنواع المقاومة مثل المستدميات، والمستنبت المضاف له البلورات البنفسجية لعزل الجراثيم سالبة غرام.

- طبيعة الصادات الحيوية وآلية تأثيرها:

أ- ذات منشأ كيميائي كالسلفاميدات Sulfonamides

ب- ذات منشأ فطري كالبنسيلين Penicillins، والسيفالوسبورين Cephalosporins

ج- ذات منشأ جرثومي كالستربتومايسين Actinomycine – Steptomycine

لقد تم تطوير عمل الصادات الحيوية بحيث تكون ملائمة لجسم الإنسان من حيث نفوذها عبر أغشية الجسم، وتركيزها في مصل الدم، وقدرتها السمية للجراثيم المختلفة وانعدام سميتها لخلايا الإنسان.

1- صادات تحل محل بعض العناصر الاستقلابية للخلية الجرثومية مثل السلفاميدات المتشابهة بالتركيب مع حمض بارا أمينو بنزوئيك الضروري لتكوين حمض الفوليك المستخدم في استقلاب الحموض الأمينية واصطناع البروتين.

2- بعض الصادات تؤثر في اصطناع الجدار الخلوي للجراثيم مؤدية إلى انحلال الخلية الجرثومية كالبنسيلين والسيفالوسبورين.

3- صادات تؤثر في اصطناع البروتينات الهيولية مثل كلورامفينيكول Chloramphinicol.

4- صادات تؤثر في النفوذية الخلوية وبالتالي موت الخلية الجرثومية نتيجة دخول وخروج المواد بشكل عشوائي مثل صادات البولي ميكسين Polymyxine، والكولستين Colistin.

5- صادات تخرب أنزيمات السيتوكروم التي تلعب دوراً في التنفس الجرثومي كالستربتومايسين.

هذه التجربة لها أهمية كبيرة في المجال الطبي حيث تمكننا من تحديد العلاج المناسب بالمضادات الحيوية في الأمراض الجرثومية.

أ- تأثير المضادات الحيوية:

يمكن إجراء مثل هذا الاختبار وفق ما يلي:

الأدوات والمواد اللازمة:

1- أطباق بتري فارغة ومعقمة.

2- وسط الآغار المغذي المعقم والمصهور بدرجة حرارة 45°م.

3- أقراص مضادات حيوية مختلفة (أقراص التحسس).

4- ملقط معقم لالتقاط الأقراص، وإبر زرع جرثومية.

6- مزارع جرثومية أو معلقات جرثومية لأنواع مختلفة عمرها من 24- 48 ساعة.

طريقة العمل:

1- وزع الآغار المصهور على أطباق بتري (نحو 20 مل في كل طبق)، واتركها تبرد وتتصلب.

2- اكتب على الأطباق الاسم والفئة واسم الجراثيم المراد استعمالها، واسم المضاد الحيوي.

3- ضع 1 مل من المعلق الجرثومي المراد دراسته على سطح الآغار المغذي في كل طبق، ثم انشره على السطح بانتظام.

4- يمكنك إجراء المراحل السابقة بطريقة الانتشار وهي كالتالي: صب جزءاً من المعلق الجرثومي على الوسط المغذي (وسط Muelier-Hinton Agar) المصهور بدرجة الحرارة 55°م، ووزعه جيداً

بداخله، ثم وقبل أن يتصلب الوسط، وزعه على أطباق بتري، واتركه ليتصلب تكون بذلك حصلت على وسط متساوي التوزيع بالنسبة للجراثيم.

5- خذ بوساطة الملقط المعقم (بعد تمريره على اللهب وتبريده) قرصاً من أقراص المضادات الحيوية المتنوعة (الشكل 26) أو قطع ورق ترشيح مشبعة بالمضادات الحيوية، وضعها على سطح الآغار السابق، وكثيراً ما نضع 2- 4 أقراص في كل طبق أو أكثر حسب قطر الطبق. إن رطوبة الوسط ستؤدي إلى انتشار متتابع للصاد الحيوي يترافق مع تناقص في تركيزه كلما ابتعدنا عن القرص.

6- احضن الأطباق مقلوبة في الحاضنة عند الدرجة 37°م لمدة 24 ساعة.

7- لاحظ نمو الجراثيم في كامل الطبق، وفتش عن وجود هالة شفافة خالية من النمو الجرثومي حول أقراص المضادات الحيوية تدعى هالة التثبيط الجرثومي Zone of inhibition (الشكل 33)، إن وجود مثل هذه الهالات الشفافة من عدم النمو يعني أن الجراثيم قد تأثرت بهذا المضاد الحيوي، أو بمعنى آخر إن المضاد الحيوي قد ثبط نمو الجراثيم، ويختلف قطر المنطقة الخالية من النمو حسب شدة تأثير المضاد الحيوي، فعندما يكون قطر التثبيط الجرثومي أكثر من 15 مم تكون السلالات الجرثومية حساسة، وعندما يكون القطر أقل من 15 مم تكون السلالات متوسطة الحساسية، وعند عدم وجود هالة تكون السلالات مقاومة، وللمقارنة بين الصادات تعطى إشارات +، ++، +++، ++++ حسب قطر هالة التثبيط الجرثومي.

8- دوّن ملاحظاتك مع الرسم.

الشكل (33): الهالات الشفافة حول أقراص الصادات

انتهت المحاضرة