الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة حماة
كلية الزراعة

علم الأحياء الدقيقة

(الجزء العملي)

الجلسة العملية التاسعة

إعداد

الدكتور عبد الواحد الطحلي

دكتوراه باختصاص الأحياء الدقيقة

جامعة حماة 2020 – 2021

الاختبارات الفيزيائية لتحديد أنواع الجراثيم

Physical Tests For Identification Bacteria Species

- **مقدمة:**

تُعَدُّ عملية تحديد وتمييز الأنواع الجرثومية من أهم الأمور في دراسة الأحياء الدقيقة، وهناك مخططات توضح لنا الاختبارات التي ينبغي تطبيقها والأسلوب الذي يجب إتباعه للوصول إلى النتيجة المرجوة، وتهدف هذه الاختبارات إجمالاً إلى التحري عن المعلومات الآتية للوصول إلى هوية الجراثيم:

- عزل الجراثيم واستنباتها بشكل نقي على أوساط مناسبة.
- دراسة الخواص المزرعية كتحديد الخصائص الشكلية للجراثيم ومستعمراتها مثل لون المستعمرة وقوامها وشكل حافتها ووجود القشور في البيئة السائلة أو تشكيل حلقة.
- دراسة مجهرية لتحديد سلوك الجراثيم تجاه الملونات، وخاصة تلوين غرام.
- دراسة فيزيولوجية كدراسة بعض الشروط البيئية المؤثرة في نمو الجراثيم كالاحتياجات الهوائية والحرارية، ودراسة مدى حاجتها من الأوكسجين لكونه من أهم الغازات التي تؤثر في نموها.
- دراسة الخصائص الحيوية الكيميائية كتخمير السكريات وإنتاج الإندول وكبريت الهيدروجين.
- تحديد طريقة التغذية.
- دراسة التفاعلات المصلية والمناعية.
- دراسة التركيبات الوراثية للجراثيم (RNA – DNA).

تتطلب هذه المهمة قدراً كبيراً من الصبر والدقة في العمل واستخدام الخبرة المكتسبة من التجارب الشخصية ومن تجارب ونتائج أبحاث الآخرين، ولا يمكن أن يقوم بهذا العمل إلا الباحثون المتخصصون، لذلك نظراً لضيق الوقت فإننا سنقتصر على التعرف وإجراء عدد من الاختبارات المهمة التي تتناول جانباً قد يساعدنا في عزل بعض الأنواع الجرثومية شائعة الانتشار وتحديدها بمعنى آخر سنقوم بإجراء الاختبارات النوعية المناسبة التي تمكننا من تمييز المجموعات والأنواع المتقاربة بالرغم من تشابهها في كثير من الصفات والخصائص الأخرى، ولكن يجب الأخذ بعين الاعتبار دائماً أن الاختبار التأكيدي أو الإضافي الذي يكون مفيداً جداً في حالة معينة يمكن أن يكون عديم الفائدة في حالة أخرى، مثال ذلك: اختبار الكاتالاز مهم جداً للتمييز بين المكورات العنقودية إيجابية الكاتالاز، وبين المكورات العقدية سالبة الكاتالاز، ولكنه غير مفيد في التمييز بين أفراد فصيلة Enterobateriaceae ففي هذه الحالة يمكن أن نلجأ إلى اختبارات أخرى مثل اختبار الإندول أو اختبار أحمر الميتيل– فوكس بروسكاوير.

1- تحديد حاجة الجراثيم لأوكسجين الهواء:

عزل الجراثيم الهوائية واللاهوائية:

يعد الأوكسجين من أهم الغازات التي تؤثر في حياة الجراثيم ونموها، وتقسم الجراثيم تبعاً لحاجتها من الأوكسجين إلى أربعة أنواع (الشكل 25).

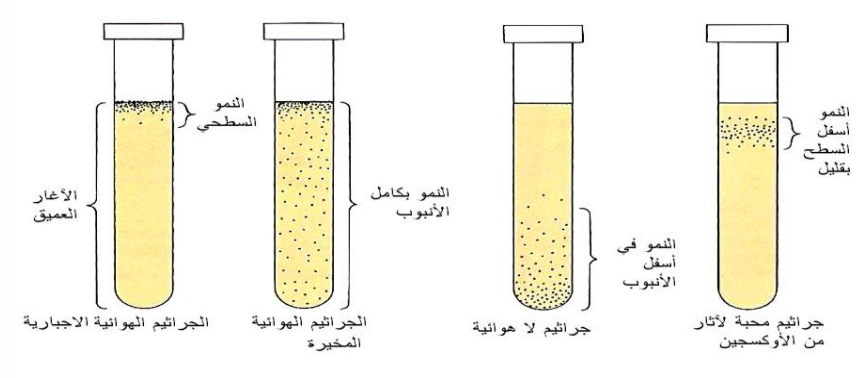
1- الجراثيم الهوائية Aerobic bacteria تنمو بوجود كميات كبيرة من الأوكسجين، وبعضها ينمو بوجود الأوكسجين الصرف وهي جراثيم تحتوي على إنزيمات الأكسدة غير قادرة على فعل الاختمار من أمثلتها *B. subtilis – Azotobacter*.

2- الجراثيم اللاهوائية Anaerobic bacteria تنمو بغياب الأوكسجين حيث لا تملك الكاتالاز Catalase التي تفكك الماء الأوكسجيني المتشكل في الخلايا إلى ماء وأكسجين لذلك يعدُّ الأوكسجين سماً لها، وهي جراثيم تحصل على الطاقة اللازمة لها من عملية التخمر من أمثلتها جنس *Clostridium*.

3- الجراثيم اللاهوائية اختيارياً Facultatively anaerobic bacteria تستطيع النمو بوجود الأوكسجين أو بغيابه، وهي قادرة على القيام بعمليات التخمر والتنفس معاً حسب توفر الأوكسجين. من أمثلتها الأنواع التابعة للجنس *Escherichia*.

4- الجراثيم المحبة لآثار من الأوكسجين Microaerophitic bacteria تنمو بوجود كميات قليلة جداً من الأوكسجين وتفضل نسبة محددة من غاز ثاني أوكسيد الكربون CO_2 (5- 10%)، وتكون حساسة تجاه الكميات الكبيرة من الأوكسجين لاحتوائها على بعض إنزيمات الأكسدة فقط. من أمثلتها جنس *Lactobacillus*.

- ويكفي لتنمية الجراثيم الهوائية أن تترك أنابيب الاختبار المزروعة تحت الظروف العادية لتوفير احتياجاتها من أوكسجين الهواء، أما إذا أريد الحصول على نمو أفضل تزاد درجة تعريض هذه المزارع إلى الأوكسجين الجوي، إما عن طريق تكبير سطح المزرعة المعرض للهواء أو عن طريق التهوية الاصطناعية لهذه المزارع.
- أما تنمية الجراثيم اللاهوائية، فتحتاج إلى طرق ومعدات خاصة للتخلص من الأوكسجين المنحل في الوسط المغذي أو الموجود في الجو المحيط بالمزارع.



الشكل 25- تحديد حاجة الجراثيم للأوكسجين بطريقة المزرعة متساوية التوزيع

الأدوات والمواد اللازمة:

1- عدد من أنابيب آغار غلوكوز بالشكل العميق.

2- إبر تلقيح جرثومية مستقيمة للوخز.

3- مزارع جرثومية لأنواع مختلفة مثل:

B. subtilis– Clostridium sporogenes – Lactobacillus lactca – E.coli

4- معلق تربة.

5- حمام مائي.

طريقة العمل:

1- اغمس إبرة التلقيح المستقيمة بعد عملية تعقيمها وتبريدها في المعلق المائي للتربة أو في أحد المزارع الجرثومية السابقة.

2- لقح الأنابيب السابقة بواحدة من هذه الجراثيم على التوالي بطريقة الوخز، ودون اسم الجراثيم على جميع الأدوات المستعملة.

3- اصهر أنابيب أخرى تحوي الوسط في حمام مائي، وبرده حتى الدرجة 45°م، ثم لقّح كل أنبوب بأحد الجراثيم السابقة أو بمعلق التربة بطريقة المزرعة المهتزة (متساوية التوزيع)، ثم حرك الأنابيب بين راحتي اليد ليتوزع الجرثوم جيداً، واترك الأنابيب لتجمد بالوضع القائم.

4- احضن الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 2-3 أيام.

5- افحص الأنابيب ولاحظ النمو في كل من الطريقتين.

6- دوّن ملاحظاتك مع الرسم.

2- تأثير درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم:

تؤثر درجات الحرارة المختلفة في نمو الجراثيم فهي تحدد سرعة نموها ومقدار نموها الكلي كما تؤثر في العمليات الاستقلابية، وفي شكل الخلايا الجرثومية، ويتميز كل نوع جرثومي بدرجة حرارة دنيا ومثلى وعظمى، وتبعاً لذلك تقسم الجراثيم إلى ما يلي:

1- جراثيم محبة للبرودة Psychrophiles تتميز بقدرتها على النمو في درجة حرارة الصفر المئوية أو أقل من ذلك أو أكثر بقليل، ولكن الدرجة المثالية لنموها هي بين 15- 20°م.

2- جراثيم محبة للحرارة المعتدلة Mesophiles نموها الأفضل بين درجة الحرارة 25- 40°م.

3- جراثيم محبة للحرارة المرتفعة Thermophiles يكون النمو الأفضل لهذه الجراثيم بين 45- 60°م، وتقسم هذه الجراثيم إلى قسمين:

جراثيم محبة للحرارة المرتفعة اختيارياً Facultative thermophiles.

جراثيم محبة للحرارة المرتفعة إجبارياً Obligate thermophiles، وهي التي لا يمكن أن تعيش إلا في الحرارة العالية نحو 60°م مثال جراثيم الينابيع الكبريتية.

يجب أن ننوه إلى أن درجات الحرارة المنخفضة لا تقتل الجراثيم، وإنما هي بشكل عام تؤمن لمعظم الجراثيم الحفاظ على حياتها حيث تتوقف الخلية الجرثومية عن القيام بنشاطاتها الاستقلابية لكنها تعود لنشاطها الطبيعي في حال توفر درجة الحرارة والبيئة الملائمين، أما درجات الحرارة المرتفعة التي تتعدى درجات الحرارة الملائمة للنمو فإنها تمنع الجراثيم عن النمو والتكاثر أولاً، ثم تقضي على حياتها.

أ – تقدير درجة الحرارة المثلى لنمو الجراثيم:

تعرف درجة الحرارة المثالية بأنها الدرجة التي تسمح بالنمو السريع لمستعمرة جرثومية خلال مدة زمنية قصيرة تتراوح بين 12- 24 ساعة، ويمكن تحديدها باختبار بسيط مبدؤه حضن المستعمرة الجرثومية المراد تحديد درجة حرارتها المثلى بدرجات حرارة مختلفة، ثم تقدير أي من هذه الدرجات أفضل للنمو.

الأدوات والمواد اللازمة:

1- مزارع جرثومية لكل من الأنواع الآتية: *B. subtilis – E. coli – Serratia marcescens*

2- أنابيب آغار مغذٍ مائل معقمة.

3- إبر تلقيح جرثومية.

4- حاضنات على درجات حرارة مختلفة: 25°م، 37°م، 55°م.

5- ثلاجة بدرجة حرارة 5°م.

طريقة العمل:

1- لقح أربعة أنابيب آغار مائل من كل مزرعة جرثومية. دون على جميع الأنابيب اسمك واسم الجراثيم وتاريخ التلقيح.

2- احضن من كل نوع أنبوبة على درجات الحرارة: 5°م في الثلاجة، 25°م في الحاضنة (يمكن الاستعاضة عنها بدرجة حرارة الغرفة)، 37°م في الحاضنة، 55°م في الحاضنة.

3- افحص الأنابيب بعد 24 ساعة، ثم يومياً لمدة أسبوع بالعين المجردة، ولاحظ معدل النمو وتكوين الألوان بالنسبة لبعض الجراثيم.

4- دوّن النتيجة في جدول كالآتي:

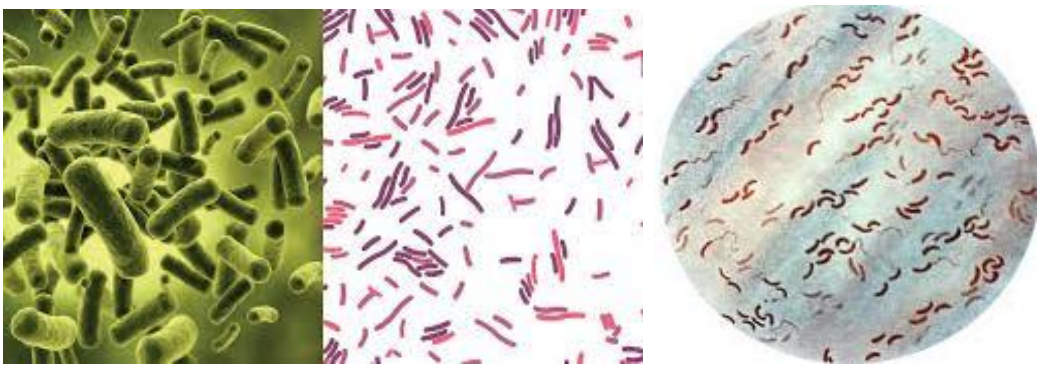
جدول رقم 4

نوع الجرثوم	معدل النمو على درجة الحرارة			
	5° م	25° م	37° م	55° م
E . Coli				
B . subtilis				
Serratia marcescens				

5- عبّر عن النتيجة كما يلي: - لا يوجد نمو، + نمو قليل أو ضعيف، ++ نمو جيد، +++ نمو ممتاز

3- تأثير درجة pH في نمو الجراثيم:

تؤثر درجة حموضة الوسط في نمو الجراثيم، ويتميز كل نوع جرثومي بدرجة pH مثالية يبلغ فيها نشاط الجرثوم الفيزيولوجي حده الأعظمي، وكثيراً ما تضاف للأوساط المغذية المختلفة مواد واقية (منظمة) Buffer solutions مثل أملاح الفوسفات والكربونات وأحياناً البروتينات لتحافظ على قيمة ثابتة لدرجة pH لأن نمو الجراثيم في الوسط يؤدي إلى تغير في درجة الحموضة، وعموماً تفضل معظم الجراثيم درجات معتدلة من pH تتراوح بين 6.5- 7.5، ولكن بعض الجراثيم كضمات الهيضة *Vibrio comma* تفضل وسطاً قلوياً (pH = 8)، والعصيات اللبنية *Lactobacillus* تفضل وسطاً حامضياً (PH = 4) لذلك نسميها جراثيم محبة للحموضة (الشكل 26)، ويمكن القول بأن درجة pH الدنيا والقصوى للجراثيم تتراوح بين 4- 9. أخيراً إن وجود شوارد الهيدروجين وشوارد الهيدروكسيل في الوسط المغذي يجعل الوسط ساماً بالنسبة للجراثيم، وتعد الأوساط الحامضية أقل سمية من الأوساط القلوية.



الشكل 26- جراثيم ضمات الهيضة *Vibrio comma*(يمين)، والعصيات اللبنية *Lactobacillus* (يسار)

الأدوات والمواد اللازمة:

1- مزارع جرثومية مختلفة.

2- إبر تلقيح جرثومية.

3- أنابيب اختبار معقمة تحتوي على المرق المغذي المحضر بدرجات حموضة مختلفة مثلاً (3-4-5-6-7-8-9) حيث يحمض الوسط بإضافة حمض عضوي مثل حمض اللبن أو حمض العنب (حمض الطرطريك) أو حمض الليمون، أما جعل الوسط قلوياً فيكون بإضافة كربونات الصوديوم.

طريقة العمل:

1- لقّح أنابيب المرق المغذي متباينة الحموضة بالجراثيم المراد دراستها. دون اسمك واسم الجراثيم وتاريخ الزرع على جميع الأدوات المستعملة.

2- ضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة مناسبة لمدة يومين، ثم لمدة أسبوع.

3- اقرأ النتيجة حسب ظهور العكر في الوسط، حيث يتناسب عدد الخلايا النامية طرداً مع درجة العكر، وإن أفضل درجة pH هي عند أعلى درجة عكارة في الأنابيب السابقة.

4- دوّن ملاحظاتك في جدول مناسب معتمداً الرموز نفسها التي استعملناها عند دراسة تأثير درجة الحرارة في النمو.

5- ارسم مخططاً بيانياً يوضح نسبة عدد الخلايا الميتة مع تغير درجات الحموضة.

الخواص الشكلية والمزرعية لبعض أنواع الجراثيم

نوع الجراثيم	خواص المستعمرات في أطباق الآغار	خواص المستعمرات في الأوساط السائلة	شكل الخلية وطريقة التجمع	نتيجة صبغة غرام	الحركة
E. Coli	بيضاء أو بيضاء مصفرة كاملة الحواف إلى متموجة	لا يوجد قشور	عصوي قصير، مفردة أو على شكل سلاسل قصيرة	سالبة	±
Proteus sp.	غير شفافة – رمادية	يوجد طبقة قشرية	عصوي قصير، مفردة أو على شكل سلاسل طويلة	سالبة	+
Proteus Arizona	رمادية، دائرية، كاملة الحواف	لا يوجد قشور	عصوي قصير	سالبة	+
Pseudomonas sp.	معظم أنواعها تنتج طبقات خاصة	تشكل قشور	عصوي قصير	سالبة	+
Erwinia sp.	مبيضة، كاملة الحواف	تشكل طبقة قشرية	عصوي قصير	سالبة	+
Staphylococous aureus	صفراء برتقالية، دائرية	لا تشكل قشور، قد تتكون حلقة	مكورة عنقودية	موجبة	–
Bacilius subtilis	بيضاء أو بيضاء مصفرة	تشكل قشور	عصوي، أبواغ متطاولة	موجبة	+

انتهت المحاضرة