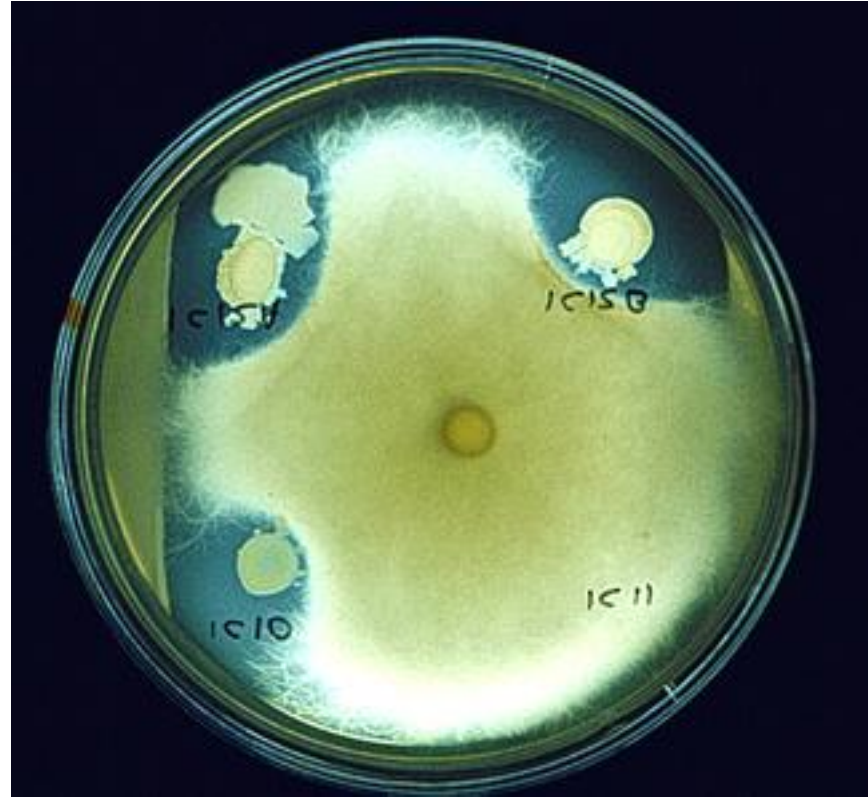


التقنية + تجربة التحقق من إنتاج المضادات الحيوية:
البكتيريا + الأكتينومييسيتات





ثلاث مستعمرات بكتيرية سبب نموها تثبيط
لنمو المزرعة الفطرية على أطراف الطبق



تجربة التحقق من إنتاج المضادات الحيوية:

بعد عزل الفطريات و الأكتينومييسيتات والبكتيريا والطحالب يتم اختبار قدرة كل واحدة منها على إنتاج المضادات الحيوية نقوم بعمل تنقية لكل كائن حي دقيق على حدى.

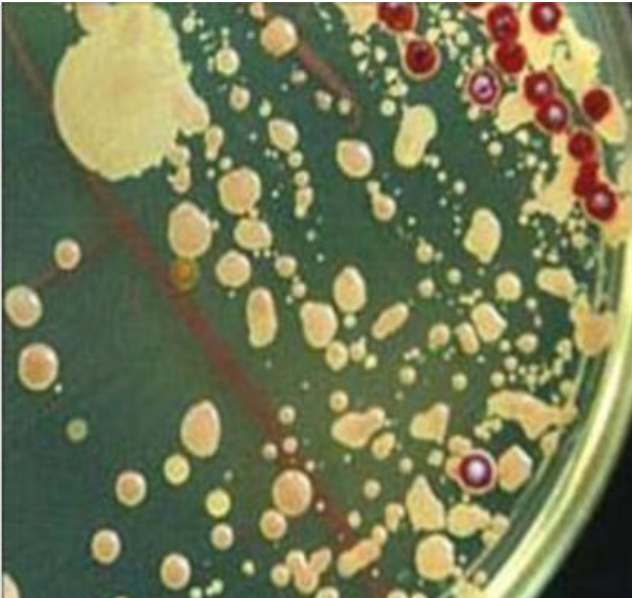
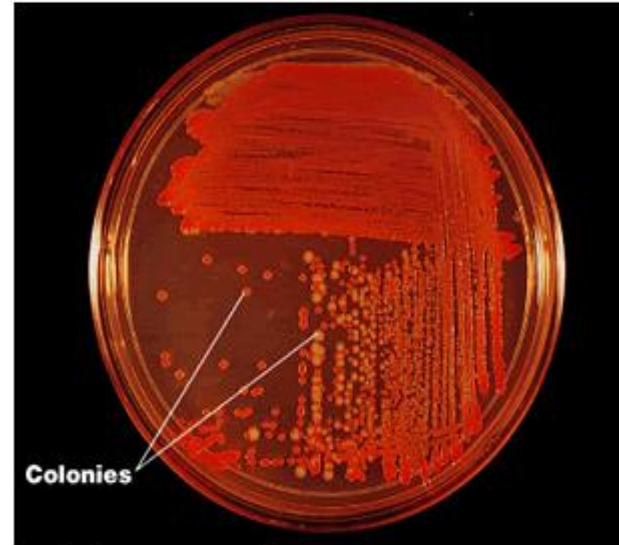
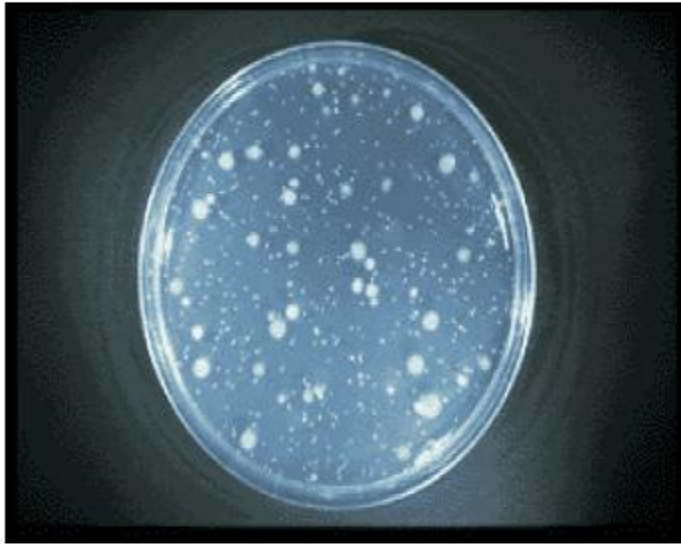
الكائن المضاد
Antagonistic Organism

الكائن المختبر
Test Organism



تنقية المزارع المختلطة

Mixed Cultures Purification



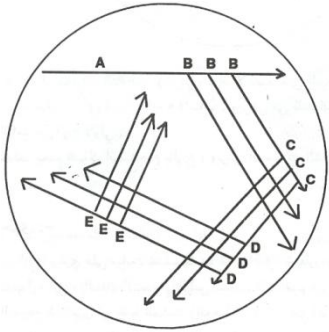


- ماهي المزرعة النقية؟
- هي المزرعة التي تحتوي على نوع واحد فقط من الأحياء الدقيقة.
- ماهي المزرعة المختلطة؟
- هي المزرعة التي تحتوي على أكثر من نوع من الأحياء الدقيقة.
- كيف يتم معمليا الحصول على مزارع نقية؟
- للحصول على مزارع نقية من البكتيريا (أو أي نوع من الأحياء الدقيقة) لا بد أولا من الحصول على مستعمرات فردية **single colonies** منفصلة عن بعضها البعض وعلى بيئات صلبة **solid media** .
- *يفترض أن تكون المستعمرة الفردية خلية واحدة من البكتيريا نمت وتكاثرت حتى كونت كومة من ملايين الخلايا البكتيرية واضحة المعالم ولها صفات الخلية الأم نفسها.



طرق عزل المزارع النقية Pure Culture Techniques

- تختلف المستعمرات النامية في الشكل, والحجم, والقوام, واللون باختلاف أنواع الكائنات الدقيقة, فان مظهر المستعمرة يعتبر دليلا قيما للتعرف على المزرعة وللتأكد من نقاوتها.



خيطية



دائرية



نقطية



مغزلية



جذرية

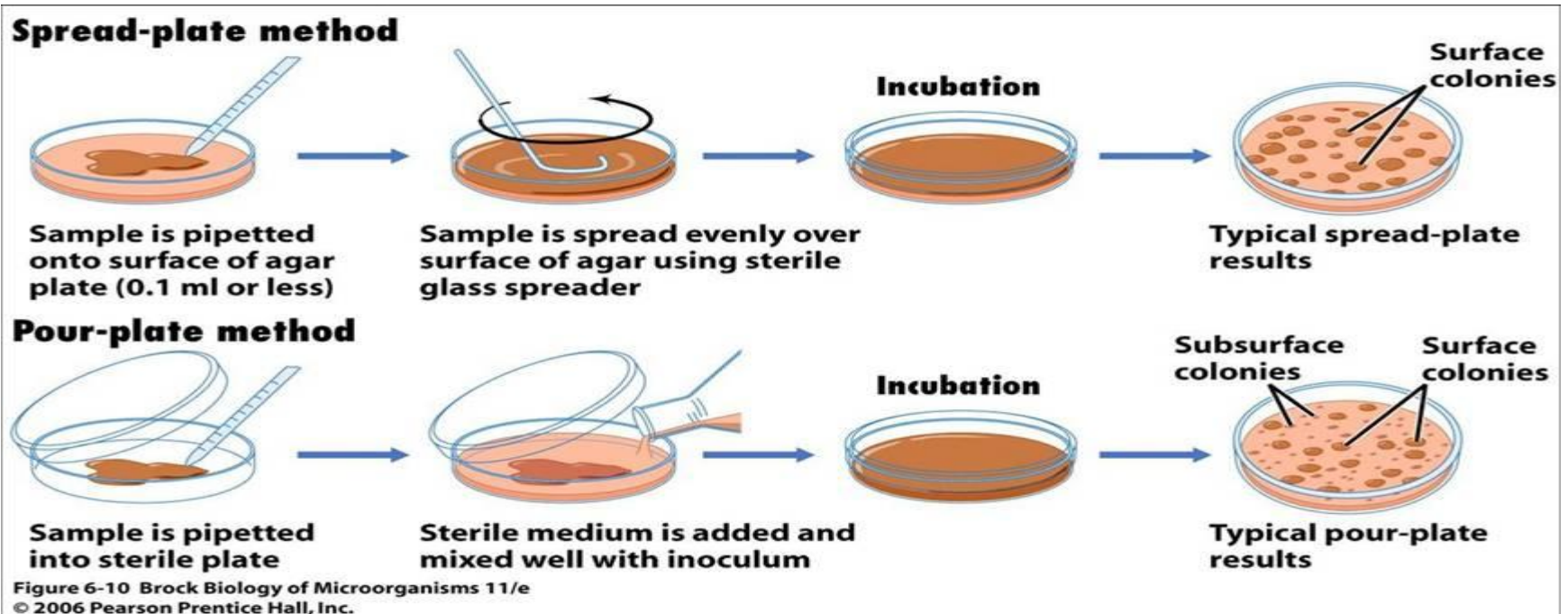


غير منتظمة

• أولاً: الأطباق المخطوطة Streak Plate :

عند وضع المزارع الميكروبية على سطح الآجار ونشرها بواسطة الإبرة ذات عقدة (loop) ، فإن هذا يسمى تخطيط (Streaking) ، ويسمى الطبق المعد بهذه الطريقة طبقاً مخطوطاً (Streak Plate) .

ثانياً: الأطباق المصبوبة Pour-plate method :

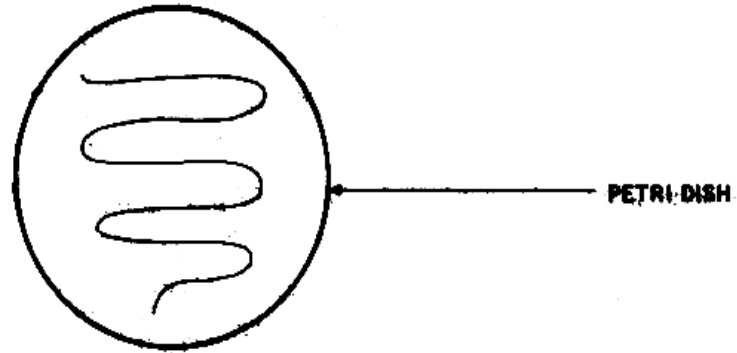
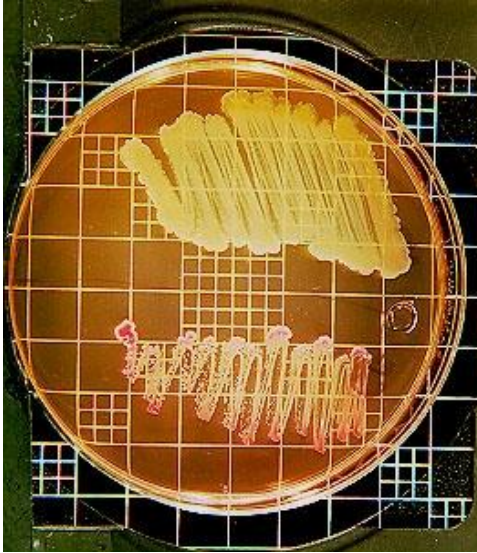




- يمكن عمل الأطباق المخطوطة بأكثر من طريقة, وهنا طريقتان مشروحتان, وكلتا الطريقتين تعطيان نتائج ممتازة إذا أجريتا بدقة, كما في الشكل التالي...

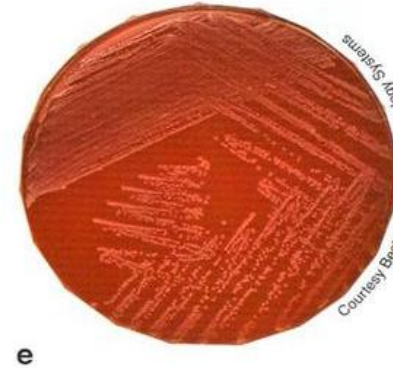
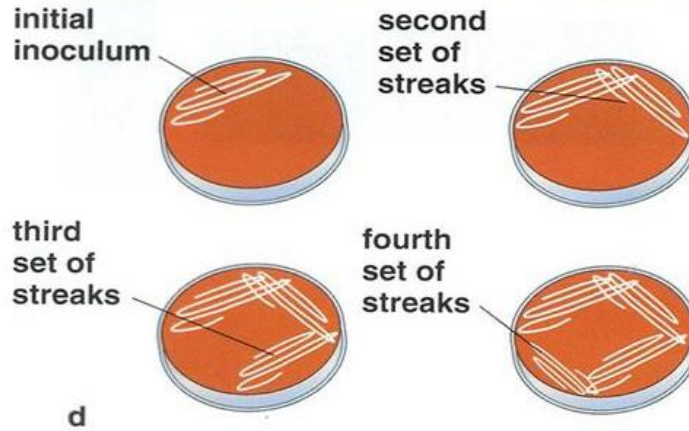
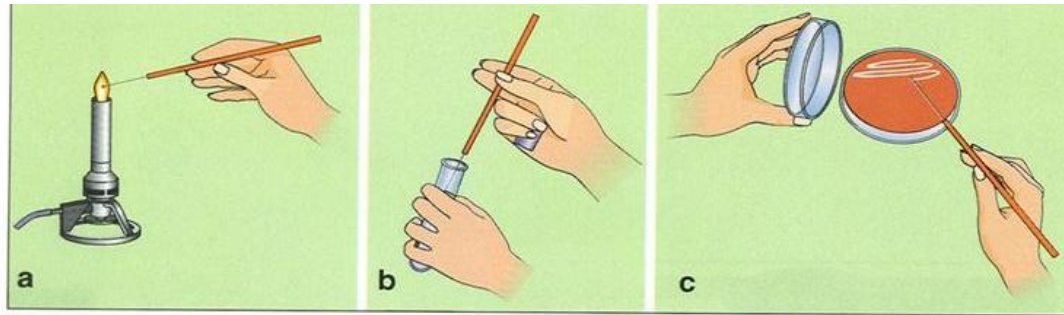
الطريقة الأولى Zigzag or Snake shape :

تعقم إبرة التلقيح ذات عقدة باللهب ثم تبرد بلمس حافة الاجار, ثم تغمس الإبرة في المزرعة, يلي ذلك التخطيط على سطح الاجار مكونة خطا متصلا يشبه الثعبان, ثم يغطى الطبق بغطائه الممسوك باليد اليسرى



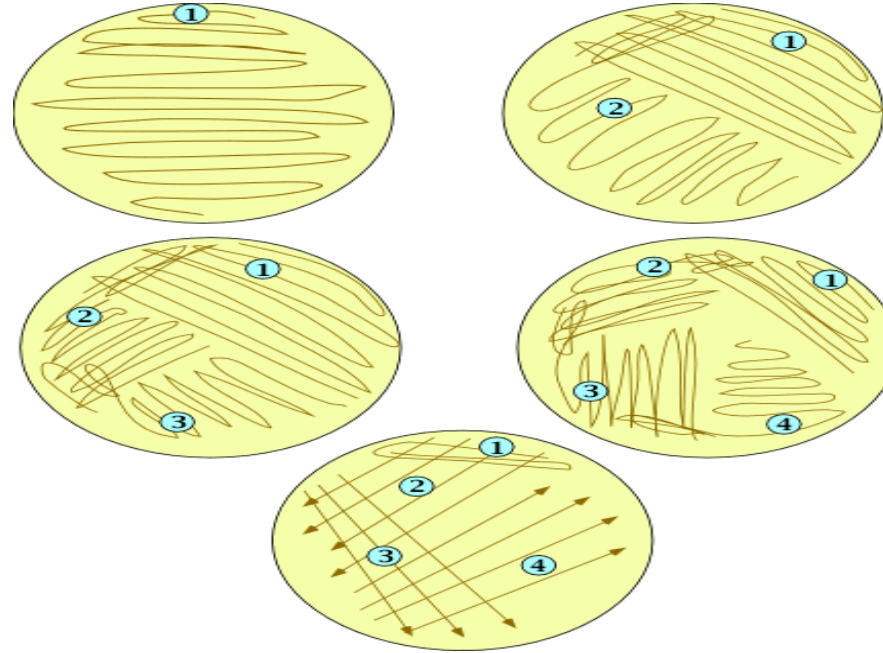
• الطريقة الثانية Crossing shape :Crossing shape

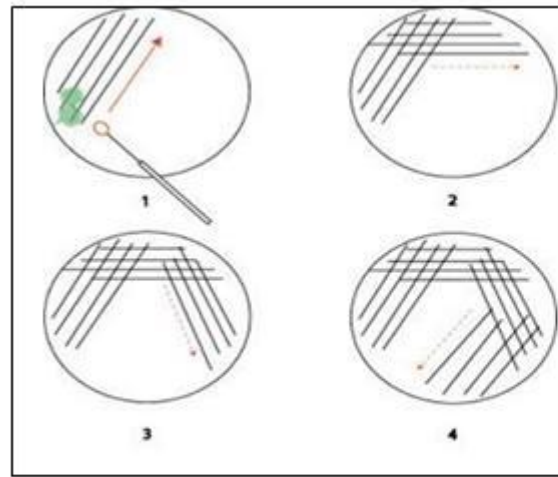
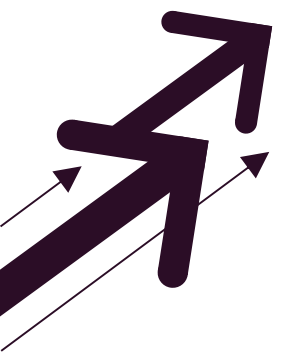
يبدأ بعمل عدة خطوط متوازية. ثم تعقم الإبرة باللهب, يلي ذلك عمل عدة خطوط عمودية على مجموعة الخطوط الأولى. تعقم الإبرة ثانية وتكرر العملية. وهكذا نحقق تخفيف المزرعة. بعد التحضين سوف تظهر المستعمرات المعزولة على مسارات بعض الخطوط.



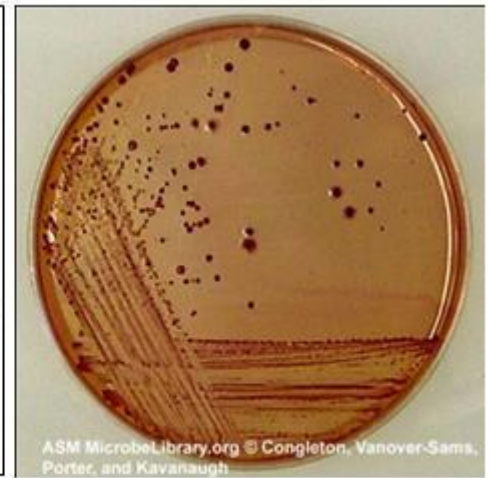


أنماط التخطيط مختلفة وعديده Various streaking Styles

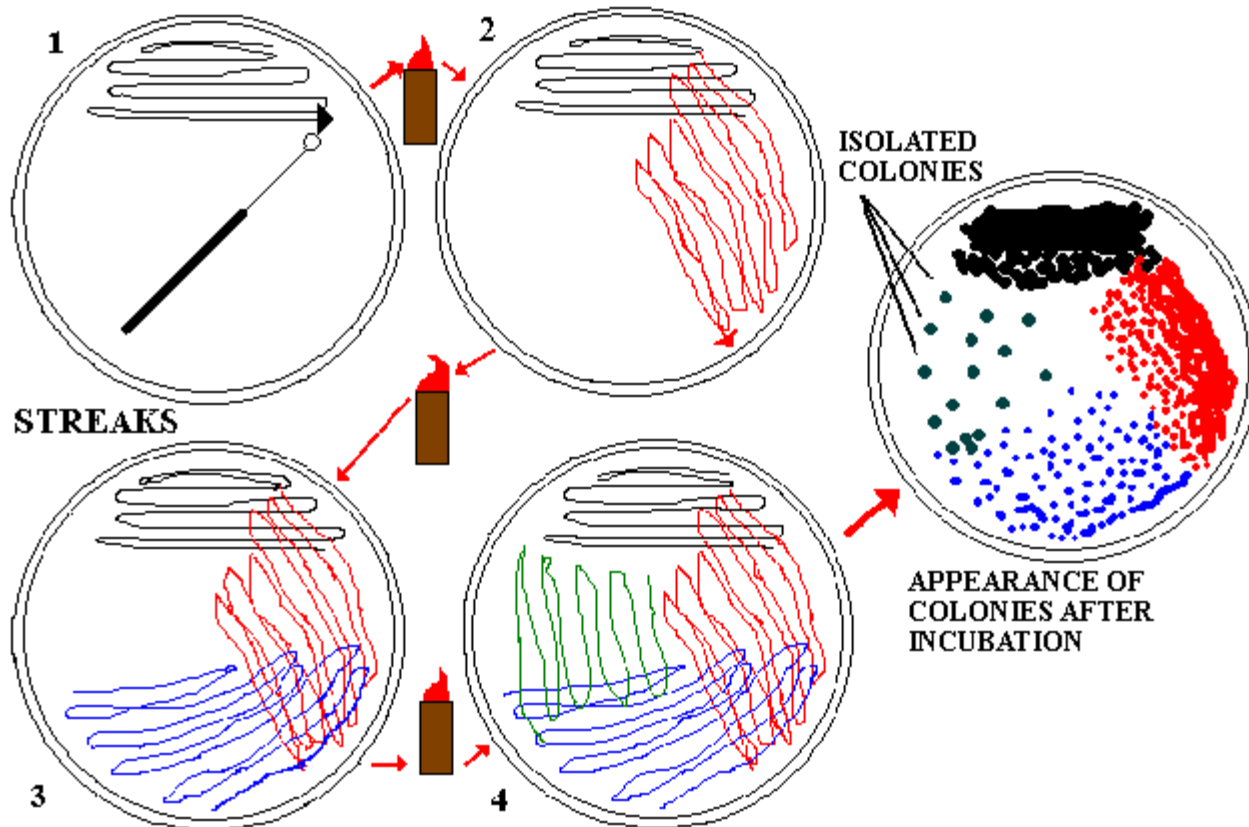




Method of streaking

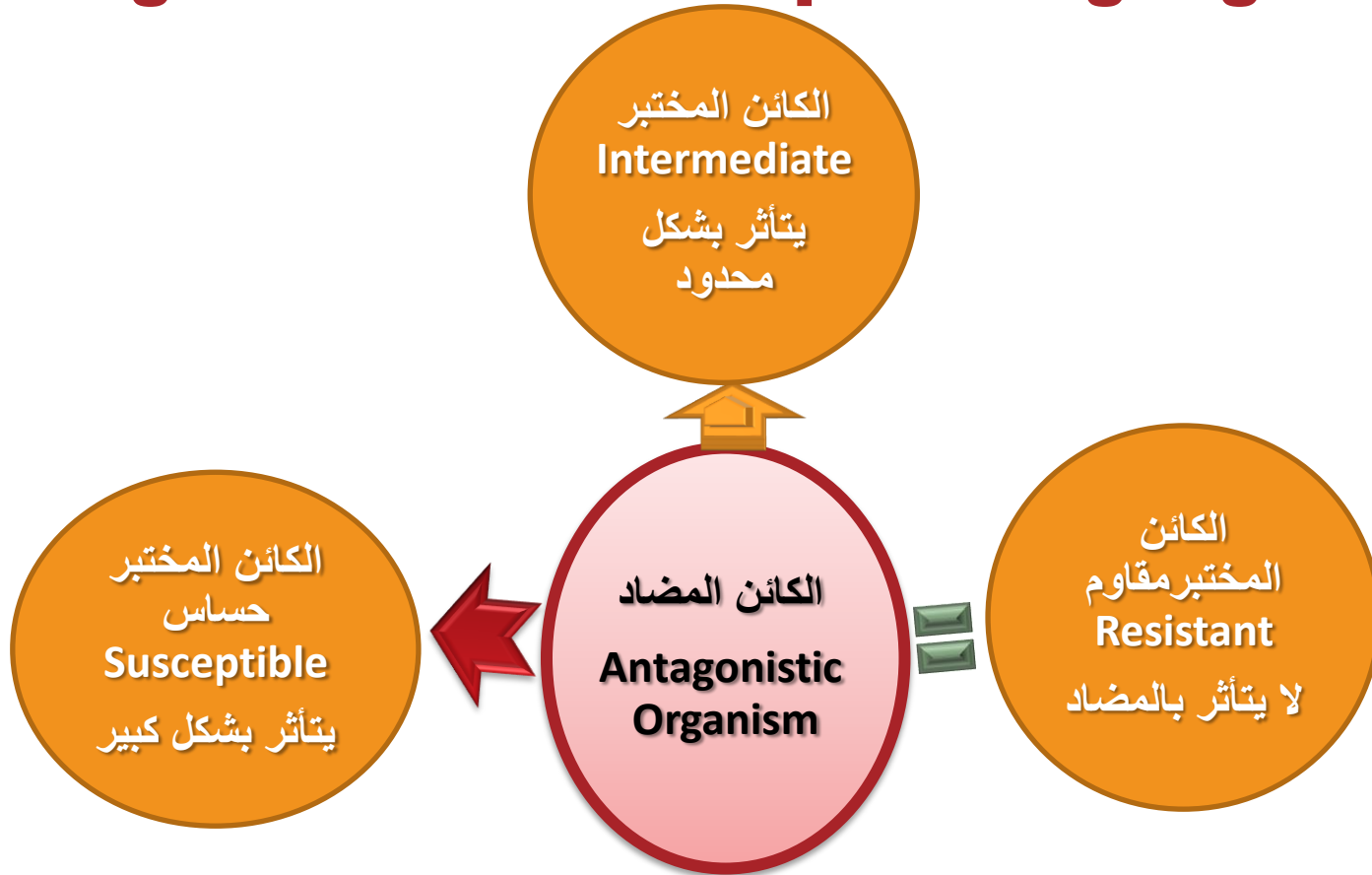


"T" Streak



ظاهرة التضاد بين الكائنات الحية

Antagonistic relationships among organisms





البكتيريا المعرضة المختبرة
:Test Organisms

Insert subtitle here



البكتيريا الممرضة المختبرة :Test Organisms

- بكتيريا موجبة لجرام

Staphylococcus aureus

و

Bacillus subtilis.

- بكتيريا سالبة لجرام

Escherichia coli

و

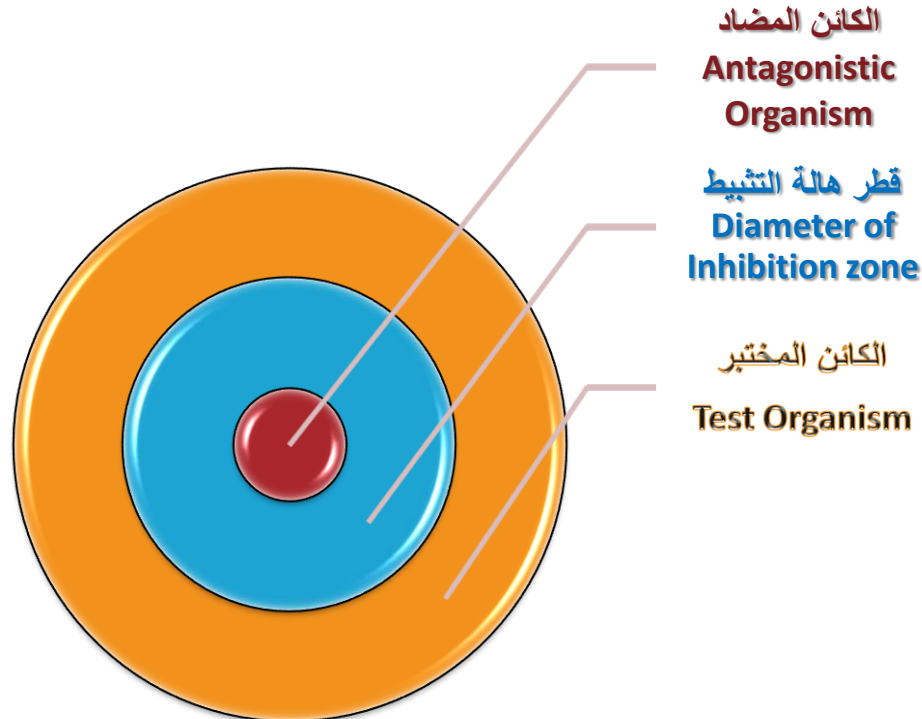
Pseudomonas putida.



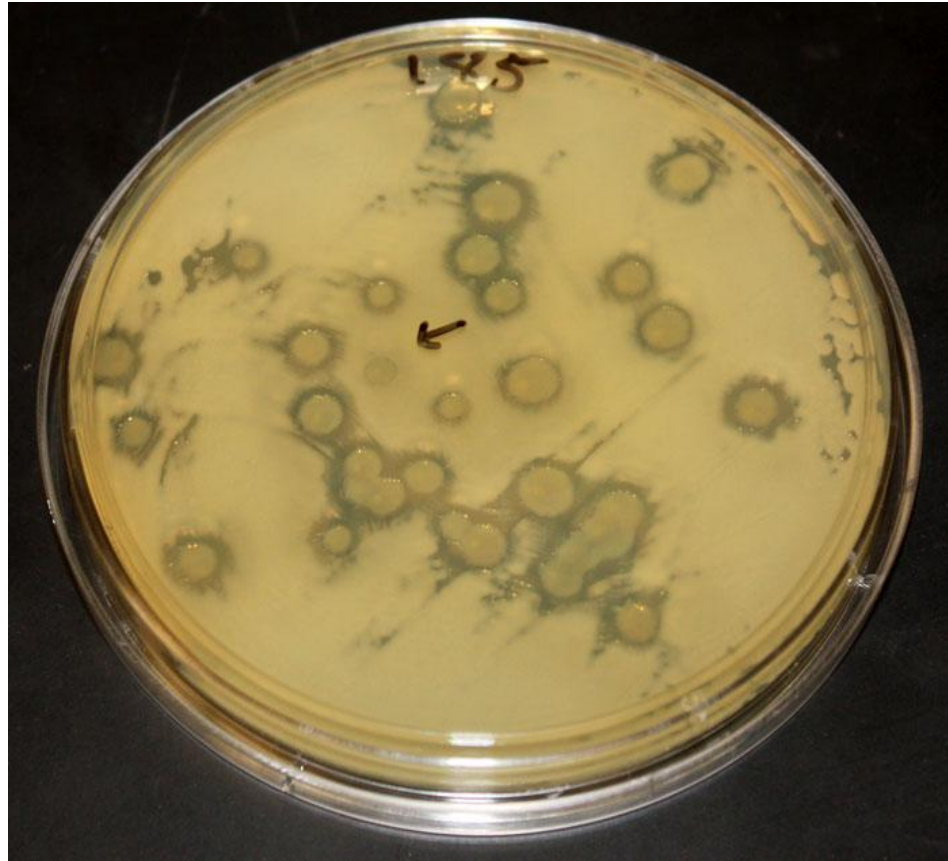
هالة التثبيط

Inhibition Zone

في حالة الكائن المختبر حساس بدرجة **محدودة** Intermediate او **شديد التأثير** Susceptible فيثبط نموه نتيجة وجود المضادات الحيوية المنتجة من الكائن المضاد فتظهر منطقه خالية من النمو حول مستعمرة هذا الكائن المضاد وتسمى :
منطقة او هالة التثبيط Inhibition zone ويزداد حجمها مع ازدياد التأثير بالمضاد المنتج وتركيزه.









كيف تحدد قدرة المضاد الحيوي المنتج على تثبيط الكائن المختبر؟

- لتحديد درجة نشاط المضاد الحيوي وفعاليتها ضد الكائن المختبر
- تُقاس المسافه (بالملم) بين حدود المستعمره للكائن المضاد **Antagonistic** المنتجة للمضاد الحيوي وحدود المنطقة الرائقة.

أثر المضادات الحيوية المنتجة من الأكتينوميسيتات المعزولة على البكتيريا الممرضة:

هناك طريقتين لاختبار قدرة الأكتينوميسيتات على إنتاج المضادات
الحيوية، أولاهما: طريقة **conventional spot**
وثانيهما: طريقة **single line streak**.

التحقق من قدرة الأكتينومييسيتات المعزولة على إنتاج المضادات الحيوية ضد البكتيريا الممرضة:

مقدمه:


- الأكتينومييسيتات المنتجة للمضادات الحيوية من التربة
- تعتبر الأكتينومييسيتات من أكثر الأحياء الدقيقة انتشارا في التربة في الطبيعة، و يمكن أن تتواجد أيضا في تربة البحار.
- حوالي ثلثي المضادات الحيوية الطبيعية الطبية مستخلصة من الأكتينومييسيتات.
- كما أن 80% من المضادات الحيوية يمكن استخلاصها من أهم أنواع الأكتينومييسيتات خاصة جنسي : *Micromonospora, Streptomyces*.
- نظرا للاستخدام الواسع المدى للمضادات الحيوية في الآونة الأخيرة أدى ذلك إلى ظهور أنواع من الأحياء الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية.
- يتصاعد عدد الأحياء الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية بصورة أسرع من القدرة على اكتشاف مضادات حيوية جديدة و فعالة في ذات الوقت.
- مما حدى بالعلماء و الباحثين إلى البحث عن أنواع جديدة من الأكتينومييسيتات في أنواع من التربة البكر.
- كما أن بكتيريا الـ *Streptomyces* (من الأكتينومييسيتات) أنتجت مدى واسع من المضادات الحيوية، وصلت إلى 2000 نوع مختلف من المضادات الحيوية، إلا أن 50 مضاد حيوي فقط كانت صالحة للاستخدام كعلاج.
- تعتبر بكتيريا *Staphylococcus aureus* من أهم الأنواع البكتيرية التي تقاوم مدى واسع من المضادات الحيوية خاصة تلك الأنواع التي تحدث الإصابة بها في المستشفيات.
- هنالك العديد من الأكتينومييسيتات التي لم تعزل بعد والتي يعتقد أنها مصادر هامة للمضادات الحيوية الطبيعية.
- 10% فقط من الأكتينومييسيتات التي يمكن أن تعزل منها المضادات الحيوية في الطبيعة دون تدخلات معملية.



:conventional spot طريقة

Insert subtitle here

طريقة conventional spot:

1. يتم تلقيح الأكتينومييسيتات على بيئة كازين النشا على هيئة بيضاوية في طرف طبق بتري  ومن ثم يحضن الطبق عند درجة حرارة 28° م لمدة ستة أيام.
2. بعد انقضاء فترة التحضين يتم تعريض الطبق للكلورفورم عن طريق وضع الكلورفورم في غطاء طبق بتري و من ثم قلب طبق بتري النامي عليه أكتينومييسيتات على الغطاء لمدة 40 دقيقة.
3. يُضاف 0.6% من بيئة الآجار المغذي الملقحة بالبكتيريا الممرضة قبل أن تتصلب على بيئة كازين النشا النامية عليها الأكتينومييسيتات. تحضين الطبق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37° م.




:single line streak طريقة

Insert subtitle here



طريقة **single line streak**:

1. يتم تلقيح الأكتينومييسيتات على هيئة خط 
2. على بيئة كازين النشا وتحضينها لمدة 4 أيام عند درجة حرارة 28°م لإعطائها فرصة لإنتاج المضادات الحيوية.
3. بعد فترة التحضين يتم تلقيح الطبق بشكل عمودي مع الأكتينومييسيتات وتحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37°م.



اختبار إنتاج المضادات الحيوية (Bacteriocin) من البكتيريا و الأكتينوميثينات:

Insert subtitle here

اختبار إنتاج المضادات الحيوية (Bacteriocin) من البكتيريا و الأكتينومييسيتات:

1. يتم تلقيح بيئة Mueller Hinton أو بيئة Brain Heart Infusion بالبكتيريا أو بالأكتينومييسيتات على هيئة خط أفقي في أعلى البيئة.

2. تحضن الأطباق لمدة 48 ساعة لإعطائها فرصة لإنتاج المضادات الحيوية كنتاج ثانوي عند درجة حرارة 37°م.

3. الكائن الحي الدقيق المنتج للمضاد الحيوي

4. ومن ثم يتم تلقيح الأنواع البكتيرية الأخرى في نفس الطبق بشكل متعامد مع اللقاح الأفقي، وتحضن لمدة 24 ساعة.

5. الكائنات الحية الدقيقة المختبرة. تُقرأ النتيجة بناء على ظهور مناطق رائقة zone of inhibition دليل على إنتاج المضادات الحيوية.

الكائن الحي
الدقيق المنتج
للمضاد الحيوي

