



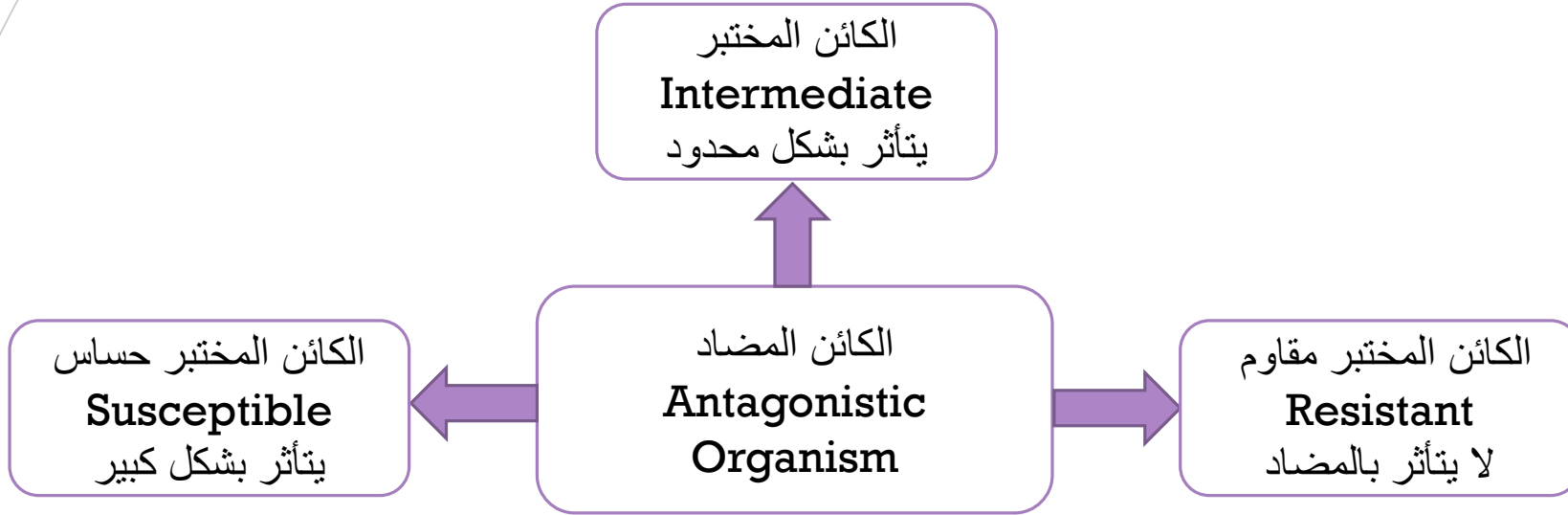
المعمل الرابع

أ. رنا القسومي

مخرجات التعلم

- ظاهرة التضاد بين الكائنات الحية الدقيقة.
- تعريف حالة التثبيط.
- الأكتينومييسيتات و المضادات الحيوية.
- التجربة الأولى.
- التجربة الثانية.

ظاهرة التضاد بين الكائنات الحية الدقيقة
Antagonistic relationships among organisms



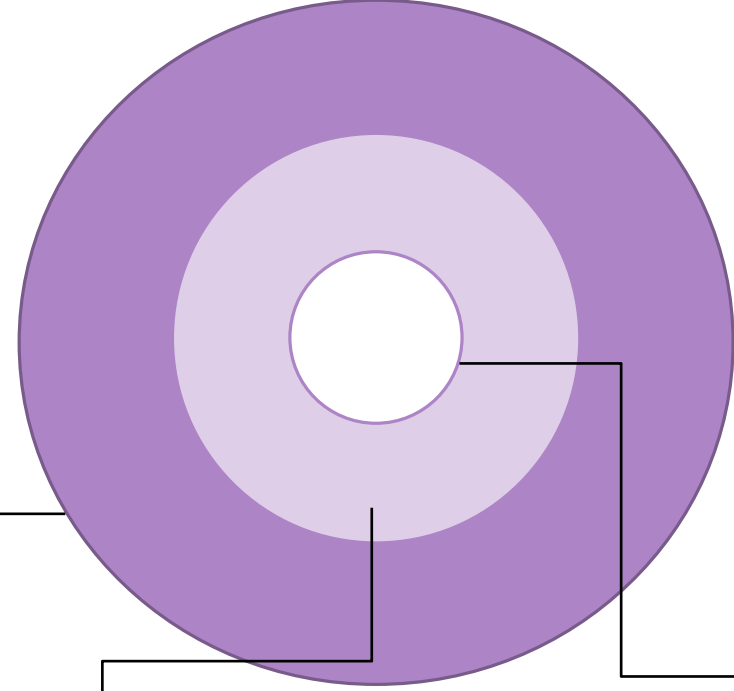
الكائن المختبر إما أن يكون حساس بدرجة محدودة Intermediate أو شديد التأثير Susceptible فيثبط نموه نتيجة وجود المضادات الحيوية المنتجة من الكائن المضاد فتظهر منطقة خالية من النمو حول هذا الكائن المضاد و تسمى هالة التثبيط Inhibition zone ويزداد حجمها مع ازدياد درجة التأثير بالمضاد المنتج و تركيزه.



الكائن المختبر
Test organism

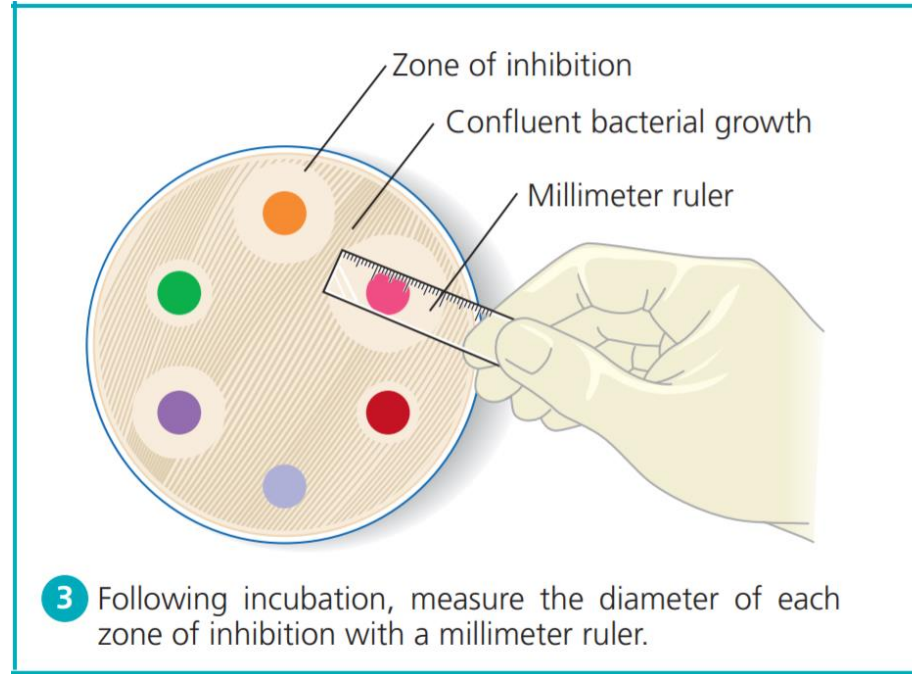
قطر هالة التثبيط
Diameter of
Inhibition zone

الكائن المضاد
Antagonistic
Organism



كيف تحدد قدرة المضاد الحيوي المنتج على تثبيط الكائن المختبر؟

لتحديد درجة نشاط المضاد الحيوي وفعاليتها ضد الكائن المختبر تقاس المسافة بالملم بين حدود المستعمرة للكائن المضاد المنتجة للمضاد الحيوي وحدود المنطقة الرائقة.



الأكتينومييسيتات و المضادات الحيوية

➤ الأكتينومييسيتات المنتجة للمضادات الحيوية من التربة:

- تعتبر الأكتينومييسيتات من أكثر الأحياء الدقيقة انتشاراً في التربة في الطبيعة، و يمكن أن تتواجد أيضاً في تربة البحار.
- حوالي ثلث المضادات الحيوية الطبيعية الطبية مستخلصة من الأكتينومييسيتات.
- كما أن 80% من المضادات الحيوية يمكن استخلاصها من الأكتينومييسيتات خاصة جنس : *Micromonospora, Streptomyces*.
- نظراً لاستخدام 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 فعّاله في الوقت ذاته.

الأكتينومييسيتات و المضادات الحيوية

- كما أن الـ **Streptomyces** أنتجت مدى واسع من المضادات الحيوية، وصلت إلى 2000 نوع مختلف من المضادات الحيوية، إلى أن 50 مضاد حيوي فقط كانت صالحة للاستخدام كعلاج.
- تعتبر بكتيريا **Staphylococcus aureus** من أهم الأنواع البكتيرية التي تقاوم مدى واسع من المضادات الحيوية.
- هنالك العديد من الأكتينومييسيتات التي لم تعزل بعد والتي يعتقد أن لها مصادر هامة للمضادات الحيوية الطبيعية.
- 10% فقط من الأكتينومييسيتات التي يمكن أن تعزل منها المضادات الحيوية في الطبيعة دون تدخلات معملية.

هناك طريقتين لاختبار قدرة
الأكتينومييسيتات على إنتاج
المضادات الحيوية

■ طريقة Spot conventional

■ طريقة Single line streak

طريقة

Spot conventional

1. يتم تلقيح الأكتينومييسيتات على بيئة كازين النشا.
2. ثم يحضن الطبق عند درجة حرارة 28°م لمدة ستة أيام.
3. بعد انقضاء فترة التحضين يتم تعريض الطبق للكلورفورم عن طريق وضع الكلورفورم في غطاء طبق بتري و من ثم قلب طبق بتري النام على الأكتينومييسيتات على الغطاء لمدة 40 دقيقة.
4. يضاف 6.0% من بيئة الأجار المغذي الملقحة بالبكتيريا الممرضة قبل أن تتصلب على بيئة كازين النشا النامية على الأكتينومييسيتات.
5. يحضن الطبق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37°م.

التجربة الأولى Single line streak

■ الأدوات:

1. الأطباق المحتوية على الأكتينومييسيتات من المعمل السابق.
2. إبرة التلقيح ذات العقدة.
3. أربعة أطباق من Starch Casein Agar.
4. بكتيريا موجبة لجرام *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus*
5. بكتيريا سالبة لجرام *Pseudomonas putida* و *Escherichia coli*
6. أدوات التعقيم.

التجربة الثانية Single line streak

■ طريقة العمل:

1. يتم تلقیح الأكتينومييسيتات على هيئة خط على بيئة كازين النشا.
2. يتم تحضينها لمدة 4 أيام عند درجة حرارة 28°م.
3. لإعطائها فرصة لإنتاج المضادات الحيوية.
4. بعد فترة التحضين يتم تلقیح الطبق ببكتيريا *Pseudomonas putida* على شكل عمودي مع الأكتينومييسيتات وتحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37°م.
5. تكرر العملية مع الأجناس الثلاث الباقية من البكتيريا.

التجربة الثالثة

➤ اختبار إنتاج المضادات الحيوية Bacteriocin من البكتيريا :

■ الأدوات:

1. إبرة التلقيح ذات العقدة.
2. بكتيريا موجبة لجرام *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis*
3. بكتيريا سالبة لجرام *Escherichia coli* و *Pseudomonas putida*
4. طبق Hinton Mueller .
5. أدوات التعقيم.

➤ اختبار إنتاج المضادات الحيوية Bacteriocin من البكتيريا :

■ طريقة العمل:

1. يتم تلقيح بيئة Hinton Mueller على هيئة خط أفقي في أعلى البيئة ببكتيريا *Pseudomonas putida*.
2. تحضن الأطباق لمدة 48 ساعة لإعطائها فرصة لإنتاج المضادات الحيوية كنتاج ثانوي عند درجة حرارة 37°م.
3. ثم يتم تلقيح الأنواع البكتيرية الثلاث الأخرى في نفس الطبق بشكل متعامد مع اللقاح الأفقي، وتحضن لمدة 24 ساعة.
4. تقرأ النتيجة بناء على ظهور مناطق رائقة **zone of inhibition** دليل على إنتاج المضادات الحيوية.

التجربة الثالثة



المراجع

- http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/346_mic-3-tdyll.pdf
- **James G. Cappuccino, Natalie Sherman. 2014. Microbiology a laboratory manual. 10th ed.**