مقرر المضادات الحيويه العملي
Antibiotics Practical Course

الفصل الدراسي الأول للعام الجامعي 1433-1434 هـ

مقدمة إلى المضادات الحيويه
Introduction to Antibiotics

تعريف :

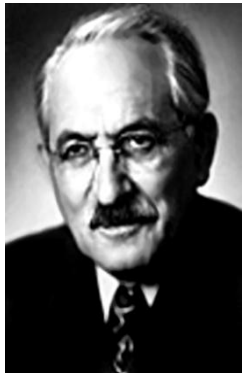
المضادات الحيوية مصلح يطلق عادة على النواتج الميكروبية.

ينتج بواسطة أحد الأحياء الدقيقة سواء فطريات أو بكتيريا أو أكتينوميسيتات.

يمكن للمضاد الحيوي أن يثبط نمو الكائن الحي الدقيق الضار أو أن يقتله تماما باستخدام تركيزات قليلة جدا منه.

و مؤخرا أصبح يشمل هذا المصطلح أيضا المنتجات الشبه طبيعية المصنعة من المضادات الحيوية الطبيعية.

مصطلح Antibiotics يعني ضد الحياة (بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة الممرضة)، أول من أطلق عليه هذا المسمى هو العالم الأميركي Selman Waxman.



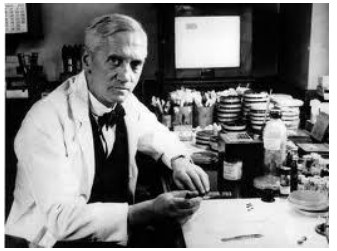
Selman Waxman

ما لفرق بين مصطلح Antibiotic و مصطلح Antimicrobial؟

Antibiotic	Antimicrobial
• أقوي في تأثيرها على الأحياء الدقيقة الممرضة.	• عادةً أضعف تأثيراً على الأحياء الدقيقة الممرضة بالمقارنه مع antibiotic.
• يُقاس التركيز الفعال من هذه المواد بالميكروجرام /مل (µg/ml) ويكون «أقل تركيز مثبط لنمو الكائن الدقيق الممرض» ويُسمى عادةً بـ MIC (Minimal Inhibitory Conc.)	• يفوق التركيز الفعال من هذه المواد 100 µg/ml .

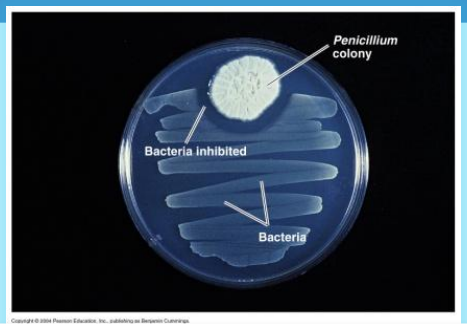
تاريخ المضادات الحيوية
History of Antibiotics

- 1927 - 1928 م.
- عمل فليمينج أبحاث مستفيضه في مستشفى Saint Mary's Hospital على النوع البكتيري *Staphylococcus aureus*



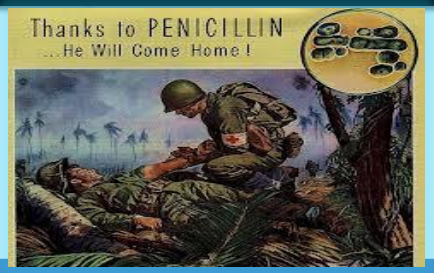
الكسندر فليمينج
Alexander Fleming

اكتشف أن أحد أطباق بكتيريا ***S. aureus*** قد تلوثت بنمو فطري والذي عرف فيما بعد بفطر ***Penicillium notatum***.



عمل العديد من الأبحاث عقب هذا الاكتشاف من عزل و تنقية للنوع الفطري المنتج للمضاد الحيوي ووجد بأن هذا المضاد فعال ضد البكتيريا الموجبة لجرام.

تابع: تاريخ المضادات الحيوية
History of Antibiotics



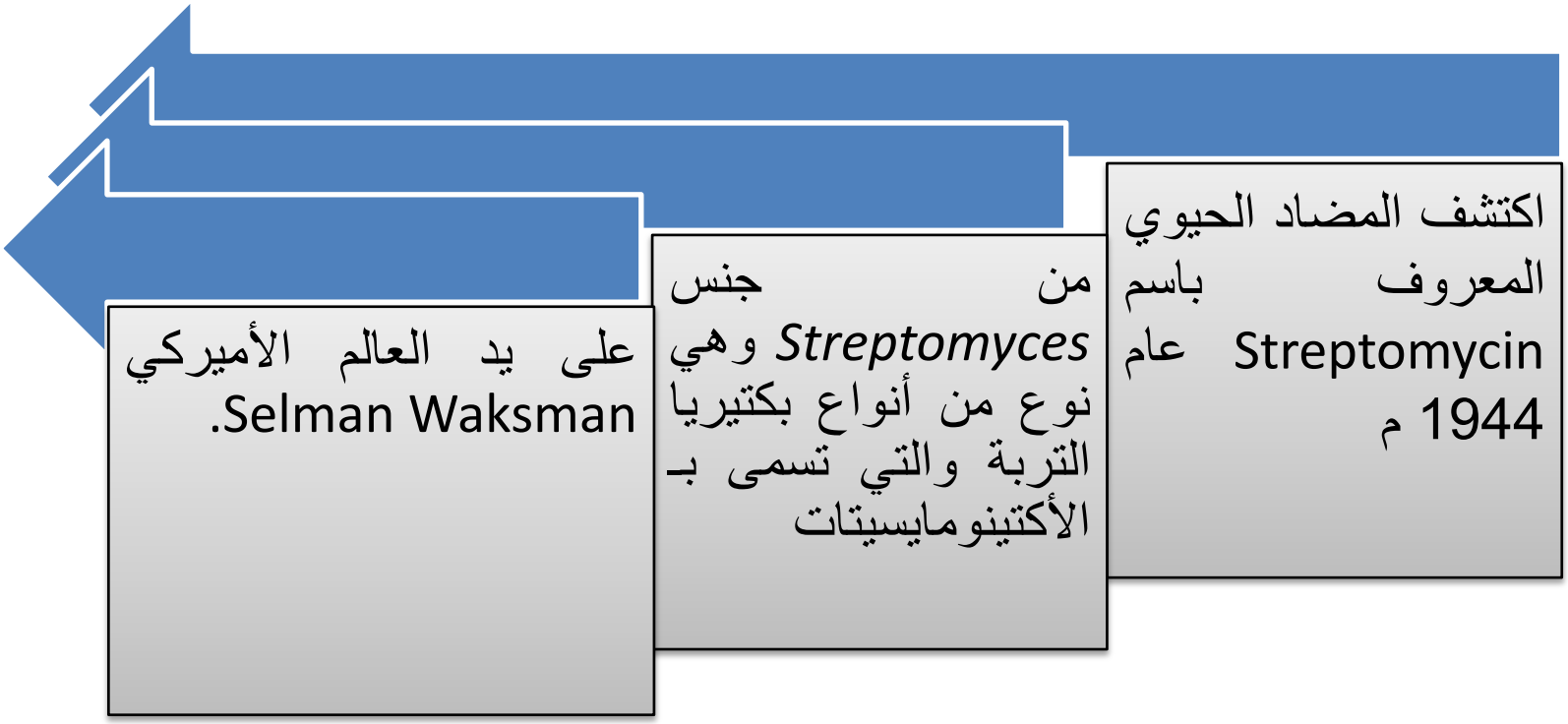
حين وقوع الحرب العالمية الثانية وحدوث نفس المشكلات مع الجنود.

Ernst Chain

Howard Florey

الكيميائي إيرنست تشين Ernst Chain و عالم الأمراض هاورد فلوري Howard Florey قاما باستخلاص المضاد الحيوي الذي ينتجه فطر *Penicillium notatum* والذي أطلق عليه اسم Penicillin.وقد حصل كلا من فليمينج و تشين و فلوري على جائزة نوبل عام 1945 م.

تابع: تاريخ المضادات الحيوية
History of Antibiotics



هناك مضادات حيوية تم استخلاصها من فطريات الجنس Aspergillus.
تم اكتشاف نوع آخر من فطريات الـ *Penicillium* والذي ينتج الـ penicillin بكميات وفيرة وهو *Penicillium chrysogenum*.

الهدف من معامل المضادات الحيوية:

عزل الكائنات الحية الدقيقة من التربة والقيام بزراعتها وتنقيتها ومحاولة دراسة ما تنتجه من مضادات حيوية وأثر هذا المضاد على النمو البكتيري، حيث تعتبر التربة بيئة غنية لعزل الكثير من الأحياء الدقيقة سواء المنتجة للمضادات الحيوية وتلك المتأثرة (الحساسه sensitive) بالمضادات الحيوية.

طريقة جمع عينات التربة للبدء بالدراسة:
Soil Sampling technique

- تجمع عينات التربة من مناطق مختلفة لإعطائنا فرصة جيدة للمقارنة.
- تؤخذ العينات على عمق 10-15 سم من التربة.
- تستخدم أداة spatula المعقمة لجمع عينات التربة ويتم وضعها في أكياس بلاستيكية معقمة محكمة الغلق (تعقم الأدوات المستخدمة بكحول 70%).
- يتم أخذ العينات مباشرة إلى معامل الأحياء الدقيقة لأغراض الدراسة.
- تجفف عينات التربة لمدة أسبوع ويتم نخلها.
- تستخدم التربة المنخولة لعزل الأحياء الدقيقة فيما بعد.

الأوساط الغذائيه المستخدمة لعزل الأحياء الدقيقة:
Media for Isolation

أهم البيئات المستخدمة لعزل الفطريات:

- بيئة Malt Extract Agar (MEA) وبيئة Potato Dextrose Agar (PDA).

أهم البيئات المستخدمة لعزل الأكتينومايسيتات:

- بيئة Starch Casein Agar وبيئة Yeast Extract.

أهم البيئات المستخدمة لعزل البكتيريا:

- بيئة Nutrient Agar (NA) وبيئة Mueller Hinton Agar (MHA) و بيئة Brain Heart Infusion Agar (BHIA).

*ملاحظة هامة:

اضافة المضادات الحيوية المناسبة لبيئة العزل المستخدمة . مثال: يمكن استخدام المضاد الحيوي Riphampicin 2.5 µg/ml و مضاد Amphotericin B 75µg/ml لتثبيط نمو البكتيريا و الفطريات على التوالي، عند دراسة عزل الأكتينومايسيتات.

العوامل المؤثرة على نمو الأحياء الدقيقة و قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية:

وجه المقارنه	البكتيريا	الفطريات	الأكتينوميسيتات
درجة الحراره (°م)	45-15	معظمها وسطية الحراره	37-28
الرطوبه	75-50% من السعه المائيه للتربه للهوائيه	تكون نشيطه عند الحد الادنى من الرطوبه-الفطريات الخيطيه معظمها هوائيه حتما	هوائيه
درجه pH	الوسط المتعادل	لها نطاق واسع بين الحموضه العاليه والقلويه الشديده	المتعادل او القلوي 8-6.5
الماده العضويه	الدبال-المواد الكربونيه	اعتماد كلي!	كميات كبيره في الاراضي الغنيه بالمواد العضويه
العمليات الزراعيه	نوع العمليه-عمق التربه-نوع المخلفات والمحاصيل	يتوقف على نوع المحاصيل	يزيد عددها مع اضافة المواد العضويه مثل مخلفات المحاصيل
المواسم	عامل ثانوي مركب تزيد في فصلي الربيع والخريف	تنشط في الربيع والخريف	عاليه في فصلي الربيع والخريف
العمق	عامل رئيسي	تتواجد في عدة طبقات وتقل مع العمق	تتناقص مع زيادة العمق

الأدوات المستخدمة و طريقة العمل:

Material and Methods

أولاً: تحضير تخفيفات متتاليه من عينة التربه باستخدام المحلول الملحي (Normal Saline):

1. عينات مختلفه من التربه.
2. ميزان – ورق للوزن- أدوات التعقيم (ديتول+قطن+كبريت)
3. كلوريد الصوديوم NaCl
4. ماء مقطر
5. دوارق سعة 250 مل
6. سداده قطنيه

الأدوات المستخدمة و طريقة العمل:
Material and Methods

- الأوساط الغذائيه المستخدمه:

أوساط ملائمه لكل من

البكتيريا- الفطريات- الطحالب- الأكتينوميسيتات

ناشر زجاجي

كحول للتعقيم

الأدوات المستخدمة و طريقة العمل:

Material and Methods

1. لكل مجموعه من الطالبات (5 طالبات/مجموعه)عينه تربه مختلفه معلومة المصدر.
2. يحضر 4 تخفيفات من التربه في المحلول الملحي 0.9% (1:10 -1:100- 1:1000- 1:10000).
3. يلقح كل طبق من الأوساط الغذائيه (نوعان لكل من البكتيريا والفطريات والأكتينوميسيتات، كل على حده) بنقل 1 مل من كل تخفيف مع مراعاة إعداد التكرارات.
4. بعد توزيع اللقاح بالناشر المعقم وتشربه داخل الأجار، تُحضن الأطباق في حضان ملائم للميكروب المراد عزله ولمده ملائمه.

تحضير التخفيفات من التربه
Preparation of Soil Suspension`s Serial Dilutions

يُحضر 100 مل من المحلول الملحي 0.9% بإذابة 0.9 جم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطرثم يعقم.

يُوزن 1 جم من التربه وينقل إلى أنبوبه 10 مل محلول ملحي باستخدام ماصه 1 مل معقمه، يُنقل 1 مل من معلق التربه المعقم إلى أنبوبه تحتوي 9 مل من المحلول الملحي المعقم- وهكذا نحصل على تخفيف 1:10

ثم ينقل 1 مل من تخفيف 1:10 إلى أنبوبه أخرى تحتوي 9 مل محلول ملحي معقم-وهكذا نحصل على تخفيف 1:100

تكرر الخطوه السابقه حتى نصل لتركيز 1:1000

المطلوب

- عللي: استخدام التربه كمصدر لعزل الكائنات الدقيقه المنتجه للمضادات الحيويه؟
- هل هناك مصادر أخرى؟
- عللي: استخدام المحلول الملحي Normal Saline في تحضير التخفيفات من التربه محل الدراسه؟
- عللي: استخدام المضادات الحيويه خلال عملية العزل من التربه محل الدراسه؟
- كتابة اسم للتجربه مع توضيح الهدف منها متبوعا بالأدوات المستخدمه وطريقة العمل.