

معمل الفيروسات العام

“ 250 MIC ”

المعمل الأخير

نورة الكبيسي

Nalkubaisi@ksu.edu.sa

2016

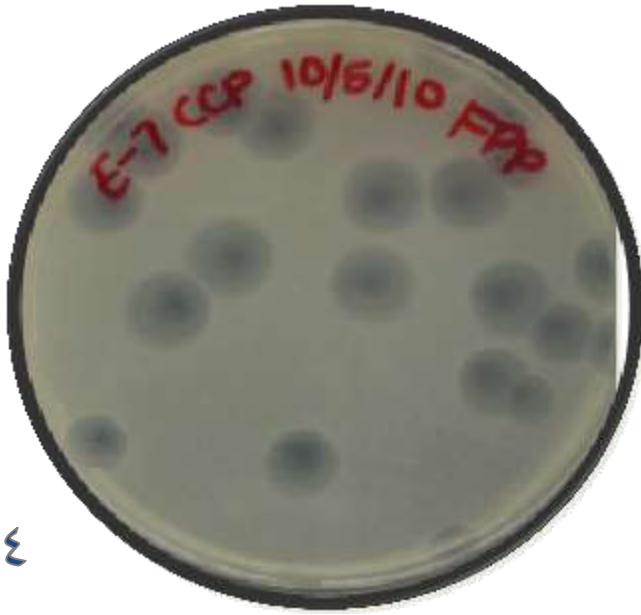
فيروسات البكتيريا

Bacteriophage



- البكتريوفاجات (Bacterio-phages) أو لاقمات البكتريا هي طرز خاصة من الفيروسات التي تتطفل على البكتريا فتعمل على انحلالها وتسبب موته او إذابتها.
- وجه الأنظار إلى هذه الفيروسات كل من العالم الأنجليزي (1915) Twort والعالم الفرنسي (1917) D'Herelle.
- **ظاهرة تورت وديرل Twort and D'Herelle phenomenon هي ظاهرة التحلل البكتيري:** تتمثل هذه الظاهرة في أن البكتريا تضار نتيجة لمسبب مرضي فيروسي ينفذ خلال المرشحات البكتيرية Filtrable virus عندما أضاف D'Herelle لمرق اللحم المغذي جزء صغير من براز مريض مصاب بالزحار ثم مرر هذا الراشح خلال مرشح بكتيري للتخلص من البكتريا وجد أن الراشح Filtrate الرائق والخالي من البكتيريا يحتوي على عامل له القدرة على تدمير بكتيريا الدوسنتاريا.

- إذا أضيفت كمية ضئيلة للغاية من هذا الراشح لمزرعة حديثة من بكتريا الدوسنتاريا فلا تلبث خلايا البكتريا من أن تذاب جميعها وتصبح المزرعة في مدى ساعات قليلة صافية شفافة بعد أن كانت من قبل عكرة كثيفة.
- يمكن تكرار هذه الحالة باستمرار إضافة هذا العامل المجهول المذيب للبكتريا إلى المزارع البكتيرية الحديثة النامية في المرق المغذي.



- كذلك لوحظ أنه إذا لامست نقطة من الراشح المحتوي على العامل المجهول بكتريا الدوسنتاريا النامية على بيئة آجار فان النمو يصبح شفافاً صافياً ويكون مأل البكتريا الهلاك في هذه المساحات الشفافة.

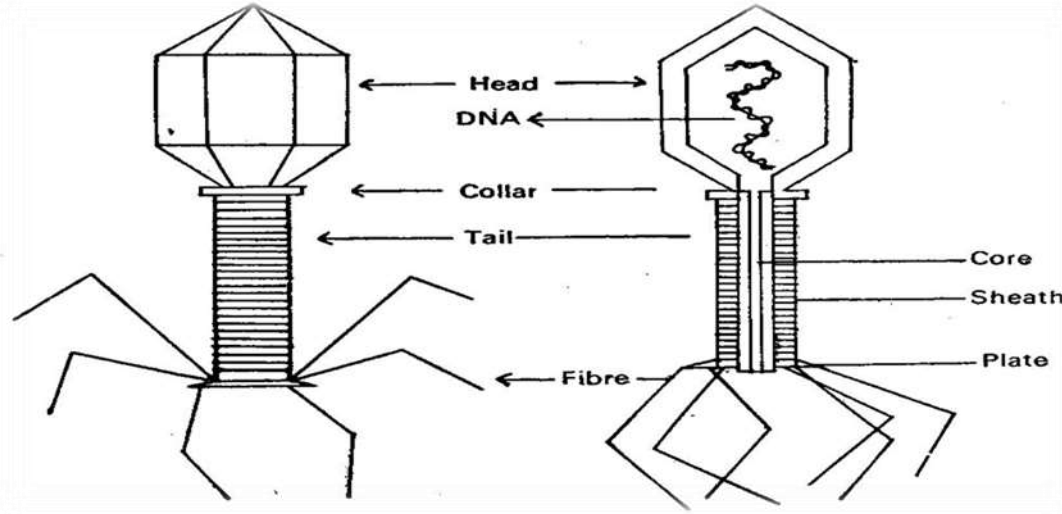
- أعتقد D'Herelle أن ما وجدته عبارة عن ميكروب حي غير منظور يتطفل على البكتريا
- أطلق على هذا الكائن الفوق مجهري اسم لاقم البكتريا المعوي Bacteriophagum intestinal
- كما اكتشف هذا العالم أن الكائن لا يقتصر طفله على البكتريا المعوية فحسب بل يؤثر على أنواع أخرى من البكتريا

- لذلك فقد أطلق اسم لاقم البكتريا أو البكتريوفاج بدلاً من الاسم القديم لاقم البكتريا المعوي وغالباً ما يختصر إلى لفظ فاج (Phage).

تتكون البكتيروفاج من :-

١. اللب (DNA-RNA).

٢. المحفظة الغطاء البروتيني.



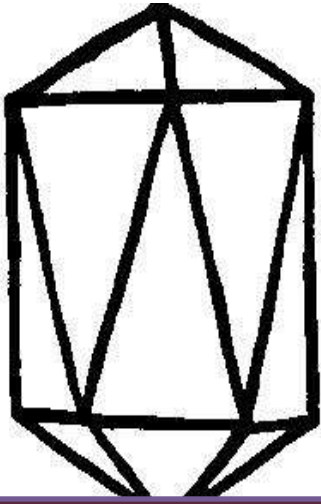
معظم فيروسات البكتيريا تكون متعددة الأوجه وبعضها خيطي او عصوي.

تعتبر فيروسات البكتيريا من المتطفلات إجبارياً على خلايا البكتيريا وأكثرها تخصص وذلك

لوجود تركيبات خاصة تساعدها على الإدمصاص واختراق الجدار الخلوي مثل fibers حيث

يتم حقن الحمض النووي الخاص بالفيروس داخل الخلية البكتيرية ثم يضاعف الفيروس

بداخلها ويزداد تعداده بها.



يمكن رؤية الفاجات

البيئات الصلبة

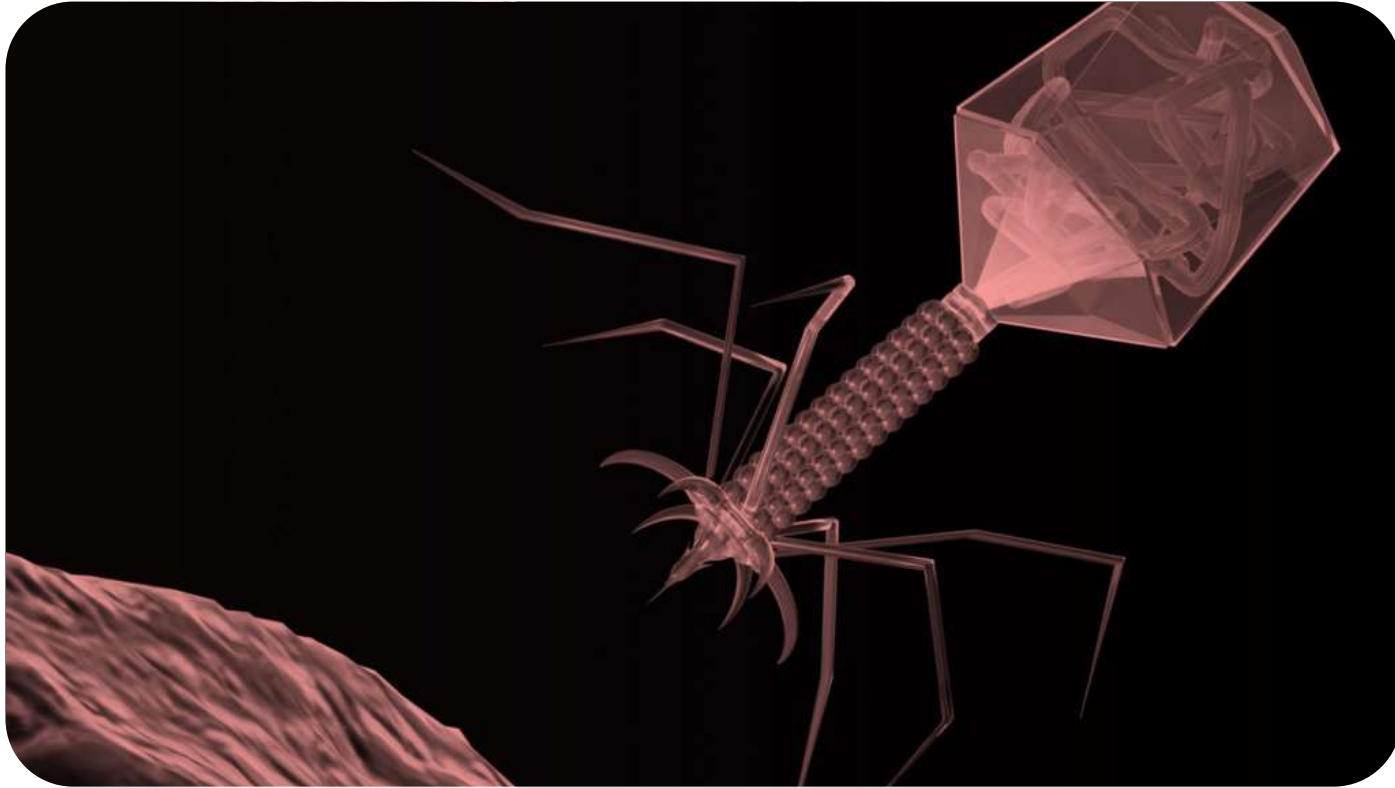
عن طريق تكوين مناطق خالية من النمو



البيئات السائلة

إزالة التعكير من البيئة أو (تعمل على ترويق المزرعة السائلة).





عزل فيروسات البكتيريا

Bacteriophage

عزل فيروسات البكتيريا

تختلف الفاجات على حسب الفلورا الطبيعية الموجودة في الوسط

التربة.

براز الإنسان والحيوان.

مياه المجاري.

مياه الأنهار.

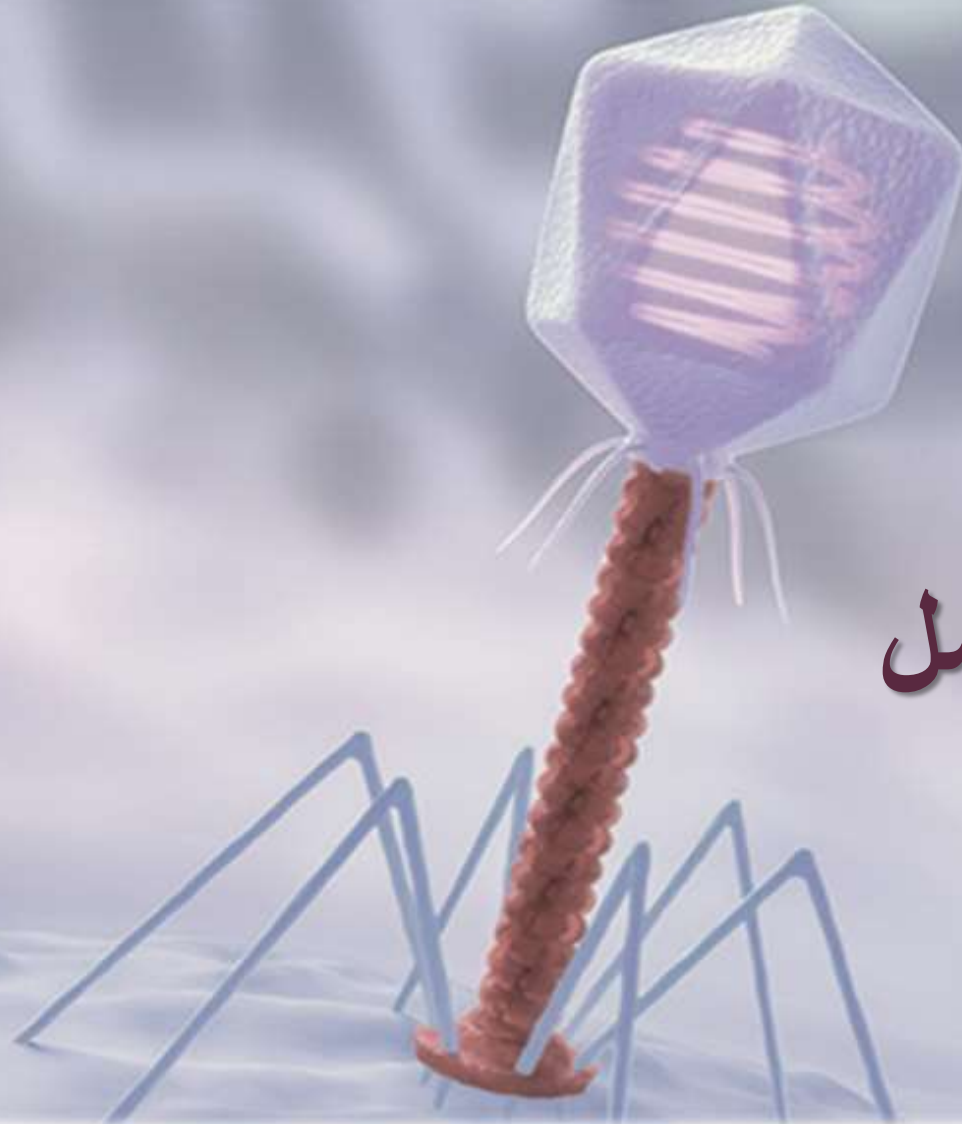
العينات المطلوبة للدراسة

العزل من اللبن الزبادي
'*Streptococcus*
'*Lactobacillus*

العزل من المياه
'(*E. coli*)

العزل من التربة
'*Rhizobium*
'(*Azotobacter*

طريقة العمل



١. يتم تحضير 25 مل من بيئة مناسبة لإكثار البكتيريا (مرق مغذي) في دورق حجمه 500 مل .

٢. تلقح البيئة بالعينة المطلوبة للدراسة ، فمثلا عينة التربة نوزن منها 1 جم ،أما مياه المجاري واللبن

الزبادي فننقل منها 1 مل باستخدام الماصة المعقمة.

٣. بعد عملية التلقيح يحضن الدورق عند 37 م لمدة 24 ساعة على جهاز هزاز shaker .

٤. بعد التحضين يترك الدورق في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة حتى تترسب حبيبات التربة

والشوائب وجدر البكتيريا المتحللة.

٥. ينقل الرائق باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوب الطرد المركزي ثم تتم عملية الطرد عند ٧٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ٣٠ دقيقة.

٦. يتكون بعد عملية الطرد الراسب (pellet) الجدر البكتيرية المتهتكة كبيرة الحجم و (supernatant) الراشح (معلق فيه الفاج بالإضافة إلى ميكروبات صغيرة) يتم نقل الـ (supernatant) باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوبة ويضاف لها كلوروفورم بنسبة ١:١٠ ويحكم غلق الأنبوبة (أي ١ مل من الكلوروفورم إلى ١٠ مل من العينة) وترج جيدا لمد ٥ دقائق.

٧. يتم عمل طرد مركزي للأنبوبة السابقة عند ٣٠٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق.

٨. بعد عملية الطرد ينقل المعلق (الفاج) باستخدام ماصة معقمة إلى أنبوبة معقمة ويحفظ عند ٤ م.

الكشف عن وجود الفاج

Spot test

أولاً: تحضير الـ Base layer

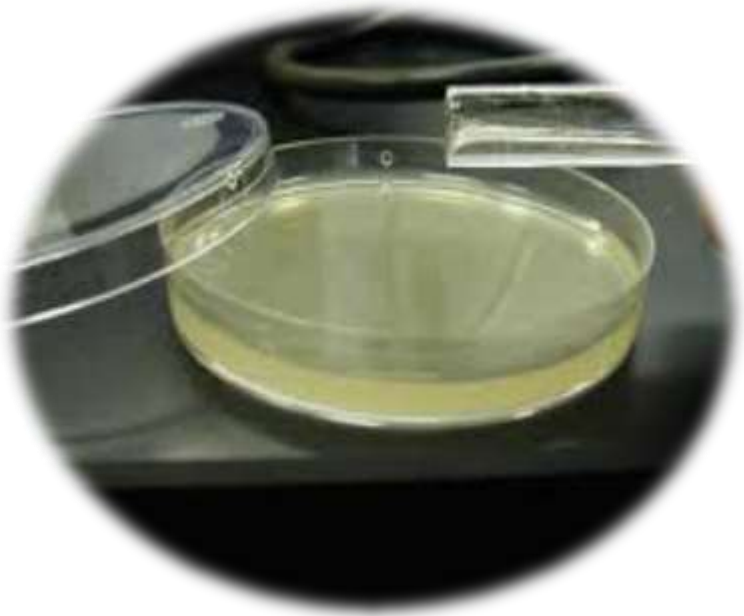
الغرض من تحضير هذه البيئة هو إمداد الميكروبات بكميات كافية من المادة الغذائية.

١. تحضير بيئة أجار مغذي (500 مل) ثم تعقم ثم تبرد عند 45 م ثم تصب في أطباق بتري

(من 30 إلى 40 مل في كل طبق) وتتم هذه العملية تحت ظروف التعقيم.

٢. تترك الأطباق في درجة حرارة المعمل حتى تتصلب.

ثانياً: تحضير الـ Over layer



وهي عبارة عن بيئة نصف صلبة.

١. يوزن 7 جم من الآجار/ لتر ثم تعقم بالحرارة الرطبة.

٢. توزع هذه البيئة في أنابيب معقمة في كل أنبوبة 3 مل.

٣. بعد تبريد البيئة تلقح كل أنبوبة ب1 مل من معلق بكتيري ثم ترج بين راحتي اليد.

٤. بعد ذلك تصب في الأطباق السابقة التحضير (Base layer) ويتم تحريك الطبق لتوزيع

الـ (Over layer) بتجانس ثم تترك فترة حتى تتجمد .

ثالثا: الكشف عن وجود الفاج

١. توضع قطرة من معلق الفاج المراد الكشف عنه على الأطباق السابقة وتترك لمدة ربع

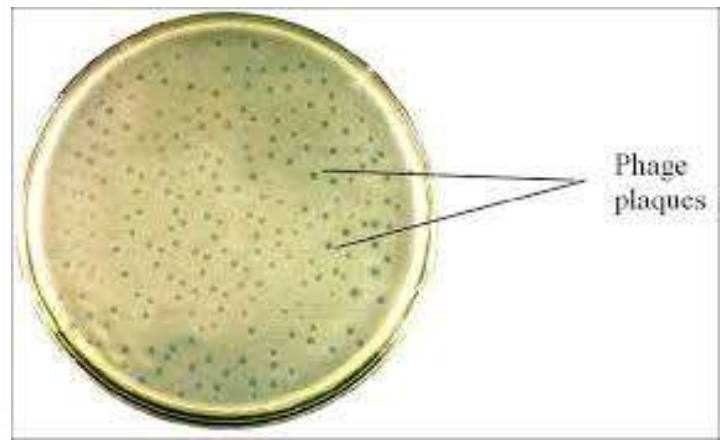
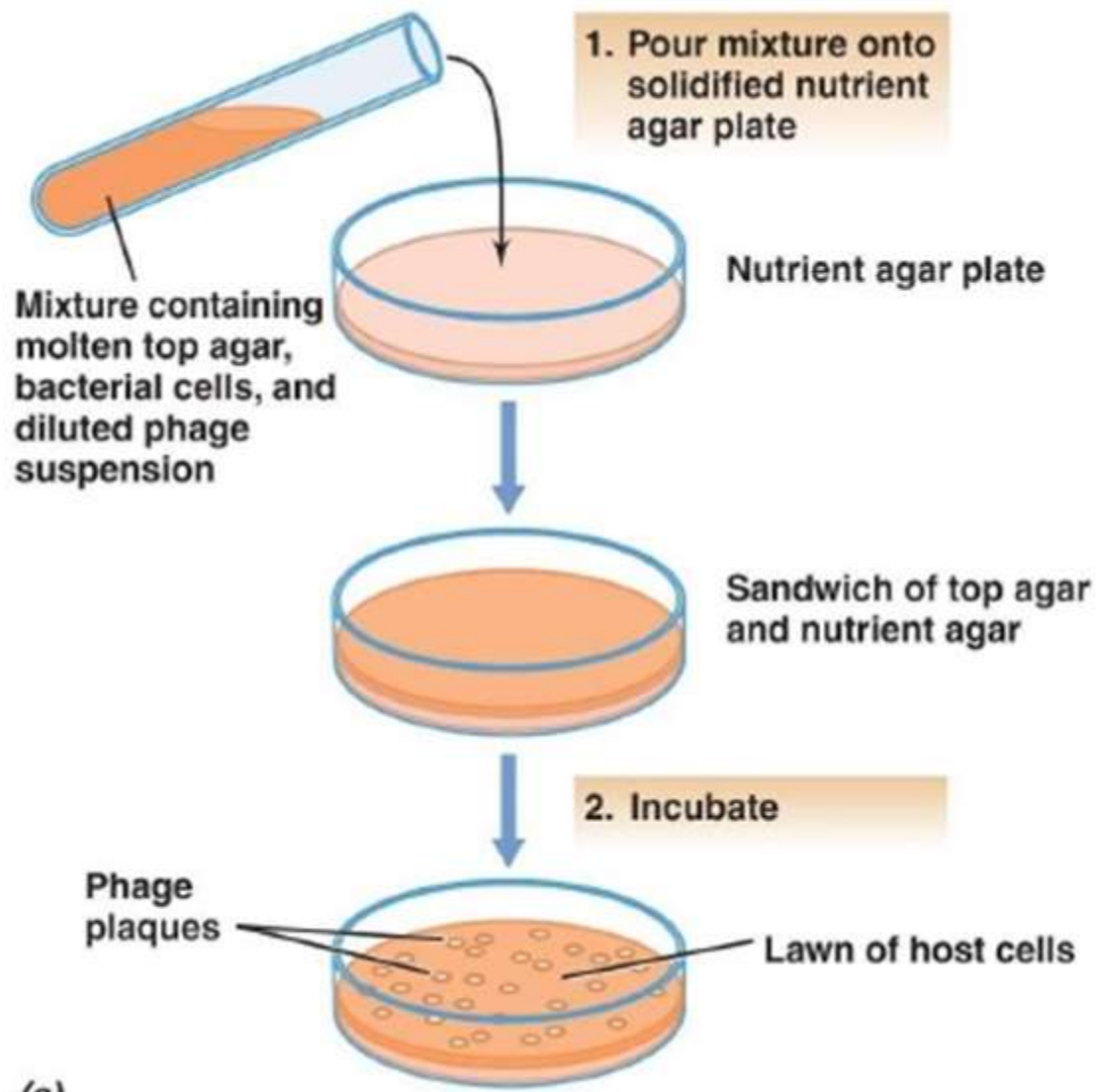
ساعة في درجة حرارة المعمل حتى يحدث إدمصاص للقطرة.

٢. تحضن الأطباق عند 37 م لمدة 48 ساعة.

٣. تحضن أطباق بدون تلقيح من معلق الفاج (كنترول) للمقارنة.

٤. يكشف عن الفاج بتكون مناطق رائقة plaque .







ASM Microbelibrary.com © Lee and MacWilliams

طريقة أخرى للكشف عن الفاج (قياس درجة التعكر):

١. نحضر أنبوتين تحتوي على بيئة سائلة وتلقح بالميكروب المتخصص للفاج المراد الكشف عنه عن عمر 24 ساعة.

٢. ثم تلقح أنبوبة واحدة ب1مل من معلق الفاج والأنبوبة الأخرى ب1مل من ماء مقطر معقم (كنترول) للمقارنة.

٣. تحضن الأنابيب عند 37م لمدة 24 ساعة.

٤. بعد التحضين توضع الأنابيب في جهاز قياس درجة التعكر وتسجل النتيجة.

النتيجة: في حالة وجود الفاج البيئة تكون رائقة والعكس في حالة إضافة ماء معقم.





نهاية المعمل الأخير

