الكواشف المعملية Laboratory Reagent

- **المضادات الحيوية المستعملة في الأوساط المغذية :**

تستعمل العديد من المضادات الحيوية Antibiotic مع الأوساط الزرعية في مختبر الفطريات كمواد إضافية لتثبيط نمو البكتريا . فالمضادات الحيوية تستعمل أساسا في أوساط العزل أو كجزء من الأوساط المحفوظة بغرض التصدير . البعض من هذه المضادات الحيوية يكون حساسا لدرجات الحرارة وبالتالي لايمكن تعقيمها في جهاز الـ Autoclave ، في حين ان هنالك مضادات حيوية تقاوم وتتحمل الحرارة المتقلبة في جهاز التعقيم .

لقد ساهمت المضادات الحيوية بشكل كبير في قتل الميكروبات ، أو كبحها ، أو توقفها عن النمو ، وقد يكون مفعول المضاد الحيوي على الغلاف الخارجي للبكتريا ، أو على الغلاف الداخلي لها ، أو يعمل على مستوى الخلية لإيقاف تصنيع البروتين وكما مبين أدناه :

١ - مضادات تعمل على الغلاف الخارجي للبكتريا Bacterial Cell Wall مثل :
- بنسلين Penicillin
- سيفلوسبورين Cephalosporin
- فانكوميسين Vancomycin
- سيكلوسبرين Cyclosporine

٢ - مضادات تعمل على الغلاف الداخلي للبكتريا Bacterial Cell Membrane
مثل:الـ نيستاتين Nystatin

٣ – مضادات تعمل على إيقاف صناعة البروتين Protein Synthesis مثل:
- ستربتوميسين Streptomycin
- كلورامفينيكول Chloramphenicol
- أرثروميسين Erythromycin
- تتراسيكلين Tetracycline

٤. مضادات حيوية تعمل على الأحماض النووية (Nucleic acid)
مثل الاكتينوميسين Actinomycin . وهذه المضادات تكبح تكون الـ (D.N,A) ولذا فانه يمكن اعتبارها مضادات للأورام(Cytotoxic Drugs) .

ومن المضادات الحيوية المستعملة بكثرة :

١. البنسلين Penicillin : عبارة عن مجموعة من المضادات الحيوية يتم الحصول عليها من الفطر الذي ينتمي إلى جنس البنسيليوم بعد معالجتها بطرق مختلفة. وإضافة لهذه البنسلينات الطبيعية توجد بعض الأنواع شبه الاصطناعية وذلك عن طريق المعالجة الكيميائية لبعض البنسلينات الطبيعية . ومن هذه الأنواع عقاقير الأمبيسلين والأموكسيسلين والبنسلين ٥ ومضادات حيوية أخرى، تعتبر كلها ذات كفاءة عالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام أكثر من البكتريا السالبة لصبغة كرام نتيجة للفرق بين مكونات جدار الخلية الموجبة والسالبة . يعتبر البنسلين قاتلا للبكتريا من خلال كبح

تكوين الجدار الخلوي للبكتريا مما يؤدي إلى عدم تكامل تركيب الجدار الخلوي وتحدث فيه فجوات مما يساعد على دخول السوائل من خارج الخلية إلى داخلها نتيجة لزيادة ضغطها الازموزي فيزيد من حجم البكتريا وبالنهاية انفجار البكتريا وموتها . أما التركيز المستخدم مع الأوساط الزرعية فيختلف باختلاف درجة التلوث المتوقع . وتجدر ملاحظة أن البنسلين لا يؤثر في الخلية الحيوانية ، فخلايا الإنسان والحيوان ليس لها جدر خلوية متيبسة كما في البكتيريا.

٢. الستربتومايسين Streptomycin : يعتبر هذا المضاد الحيوي نشطا في مقاومة البكتريا السالبة (-G) والموجبة لصبغة كرام (+G) ، ويعمل كقاتل للبكتريا عن طريق تداخله في عمليات تخليق بروتيناتها الطبيعية .

٣. الكلورمفينيكول Chloramphenicol : يعتبر مضاد حيوي واسع الطيف ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، ويظهر تأثيره في أنه يمنع بناء البروتين في خلية البكتريا ، ويمكن إضافة هذا المضاد الحيوي إلى الوسط المغذي قبل عملية التعقيم .

٤. الجنتاميسين Gentamycin : مضاد حيوي ذو تأثير قاتل للبكتيريا، فهو يعمل على تثبيط تخليق بروتينات الخلايا البكتيرية الحساسة له، و تظهر فاعليته أساساً ضد كثير من البكتيريا السالبة لصبغة كرام مثل أنواع كلبسيلا وسودوموناس و بروتياس . كما أنه فعال ضد بعض أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة كرام مثل سلالات الستافيلوكوكس التي تقاوم تأثير البنسيلين .

٥. السيكلوهكسمايد Cycloheximide : هذا المضاد الحيوي فعال ضد بعض الفطريات خاصة الفطريات مزدوجة الشكل ، ويعمل المضاد على تثبيط بناء البروتين في خلايا الأحياء الدقيقة الحقيقية النواة ، ولا يؤثر إطلاقا في البكتريا . يستعمل في الأوساط المغذية بتركيز 0.5 mg/ml من الوسط المغذي .

المضادات الحيوية المذكورة أعلاه يمكن استعمالها بمفردها أو مخلوطة مع بعضها البعض حسب الحاجة إليها .

مضادات الميكروبات : Antibacterial :

١. أحمر البنجال (Rose Bengal) : عبارة عن صبغة قرمزية اللون تستعمل في الأوساط المغذية لإيقاف نشاط بعض الفطريات سريعة النمو ، للصبغة أيضا تأثير واضح ضد بعض أنواع البكتريا ولكنها تستعمل أساسا عند عزل الفطريات من التربة والهواء . وتجدر الإشارة هنا إلى ان الوسط المغذي المحتوي على احمر البنجال يجب ان لا يتعرض لضوء الشمس المباشر ، حيث ان التفاعل المعاد نشاطه ضوئيا يجعل الوسط دون فائدة .

٢. أكردين البرتقالي (Acridine Orange) و الأكريفلافين (Acriflavine) : كلا النوعان من المضادات الميكروبية لهما تأثيرات على إيقاف نشاط وموت البكتريا عندما يضافان إلى الأوساط المغذية بتراكيز منخفضة . وفعالية هذه المركبات محصورة ضد مدى واسع من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام .

أوساط التحميل والصبغات : Mounting and Staining

هناك العديد من أوساط التحميل والصبغات التي تستعمل عادة في مختبر الفطريات بغرض توضيح التراكيب الخلوية المختلفة للفطريات ، ولمعرفة حجم الخلايا وشكلها . يستعمل أحيانا الماء كوسط تحميل ولكن هذه التحضيرات سرعان ما تجف . ومن أكثر أوساط التحميل والصبغات المستعملة في مختبر الفطريات صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن Lactophenol Cotton Blue . وهذه الصبغة جيدة لتوضيح سبورات الفطريات والحواجز العرضية خاصة في الفطريات الكيسية.

Lactophenol Cotton Blue Stain

Cotton blue	1 g
Phenol crystals	20 g
Glycerol	30 ml
Lactic acid	15ml
Distal water	20ml

ثم تتبع الخطوات الآتية في التحضير :

- يذاب ازرق القطن في الماء المقطر .
- تضاف بلورات الفينول إلى حامض اللاكتيك ، وتسخن قليلاً لإذابة البلورات ، ثم يضاف الكليسيرول ، وأخيرا يخلط المحلولين ويرجان جيدا .
- تحفظ الصبغة بدرجة حرارة الغرفة .

تعمل هذه الصبغة كمحلول مركب وصبغة في ذات الوقت ، فحامض اللاكتيك يعمل على حفظ التراكيب الفطرية ، والفينول يعمل على قتل خلايا الفطريات ، والكليسيرول يمنع التحلل ، وأخيراً يعمل أزرق القطن على صبغ التراكيب الفطرية ليسهل تمييزها .

تشخيص الفطريات :

١. الفحص المظهري للمستعمرات Morphology Examination of the colony

يعد الفحص المظهري أحد الوسائل المهمة التي يجب الأخذ بها للتفريق بين الفطريات ، ويشمل عدة أمور يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار منها ، عدد الأيام التي يستغرقها الفطر لبدء النمو ، وبعد ظهور النمو على سطح الوسط الزرعي يتم فحص شكل المستعمرة الظاهري ولونها ونسجتها (مسحوقيه ، قطنية ، زغبية) ، ويتم فحص لون المستعمرة من الجهة المعاكسة Reverse side ، كما يتم قياس قطر المستعمرة بعد توقف النمو ، وتوجد هناك مفاتيح تصنيفية خاصة لتشخيص الأنواع الفطرية .

٢. الفحص المجهري للمستعمرات Microscopial Examination of the colony

تم إجراء هذا الفحص لدراسة الصفات المجهرية للفطريات وأشكالها وتفرعاتها ، وكذلك الكونيديات بأنواعها وأشكالها وأحجامها وعددها وثخن جدارها ، وكذلك ملاحظة السبورات الكلاميدية Chlamydospores والسبورات المفصلية Arthospores .

ويتم هذا الفحص بوضع قطرة من صبغة اللاكتوفينول أزرق القطن على شريحة زجاجية نظيفة بواسطة إبرة التلقيح المعقمة Needle وينقل جزء من الخيوط الفطرية من المنطقة الواقعة بين المركز والحافة إلى الشريحة الزجاجية ، وتمزج مع الصبغة ، ثم يوضع عليها غطاء الشريحة ونضغط عليها بلطف بواسطة قاعدة أداة التلقيح Loop لغرض فرش العينة على هذه القطرة ، ثم تجفف الشريحة أما بوضعها في فرن دافئ وذلك يستغرق وقتا طويلا ، لذلك تسخن الشريحة على مصباح بنزن لفترة قصيرة حتى تجف العينة . تفحص الشريحة المحضرة تحت القوة الصغرى 10x أولاً ثم تحت القوى الكبرى 40x ، لملاحظة الخيوط الفطرية وأشكالها وتفرعاتها ، والكونيديات بأشكالها وأحجامها المختلفة Micro and Macro conidia وطريقة ترتيبها على الخيوط الفطرية ، وأيضا يعتمد على المفاتيح التصنيفية في التشخيص .

ملاحظة : إذا أردنا حفظ الشريحة المحضرة لفترات طويلة فيجب تنظيف حواف غطاء الشريحة بحذر باستعمال مناديل ورقية أو أوراق ترشيح ، ثم نصبغ الحواف بطبقة سميكة من طلاء الأظافر ، ثم نضع الشريحة في مكان جيد التهوية لتجف تماما .