٥٤٢٢٧

الطرق المعملية الميكروبيولوجية
للكشف عن الميكروبات فى الأغذية
السالمونيلا والشيجيلا
Salmonell & Shigella
والمواصفات المصرية والعالمية الميكروبيولوجية

دكتور
عماد الدين جمال جمعة
أستاذ ميكروبيولوجي الأغذية - قسم علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة - جامعة الإسكندرية

الطبعة الأولى
٢٠٠٧ م

الناشر
دار الوفاء لدنيا الطباعة والنشر
تليفاكس ٥٢٧٤٤٣٨ - الإسكندرية

الطرق المعملية الميكروبيولوجية
للكشف عن الميكروبات فى الأغذية
السالمونيلا والشيجيلا

مقدمة

الحمد لله رب العالمين.. حمدا كثيرا و أشكره عز و جل أن وفقني إلى نشر الإصدار الأول من هذا الكتيب و الذي أسحوذ على الكثير من فكري و وقتي حتى يكون في صورته هذه.

و هذا الكتيب يشرح و بطريقة مبسطة للغاية كل ما هو متعلق بميكروبي السالمونيلا و الشيجيلا و الأفراد التابعة لهما أبتدأ من موقعهما التقسيمي تبعا لأخر طبعة، إلى جانب أهم الصفات المورفولوجية لهما و الأعراض المرضية التي تسببها الأفراد التابعة لهما و مصادرها، و طرق الوقاية من أخطارها.

ثم ينتقل هذا الكتيب لشرح أدق التفاصيل للعديد من الإختبارات الميكروبيولوجية المستخدمة في عزل و غربلة و التعرف على جميع الأفراد البكترية التابعة لكل من السالمونيلا و الشيجيلا في المواد الغذائية و كيفية التفرقة بينهما بإستخدام الإختبارات البيوكيميائية فضلا على التعريف بالأساس العلمي لهذه الإختبارات.

و تعتمد الطرق الميكروبيولوجية المعملية في هذا الكتيب على إستخدام العديد من البيئات الغذائية culture media و الدلائل الداخلة في تركيبها لعزل و التفرقة بين الأفراد المختلفة التابعة لهذه الجنسين مع وجود العديد من بدائل للبيئات الغذائية الأخرى المتاحة حتى تكون هناك قاعدة عريضة للتمكن من التعرف عن هذين الجنسين و الأفراد التابعة لها.

و رغم ظهور طرق حديثة أخرى للكشف و التعرف على الأجناس البكتيرية و الأفراد التابعة لها بدقة متناهية مثل طرق Polymerase Chain Reaction (PCR) إلا أنه لا غنى عن إستخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية و المستخدمة معمليا في عزل و تصنيف الأجناس البكتيرية و الأفراد التابعة لها و هذا للعديد من الأسباب يأتي أولها في التكاليف الباهظة لأسعار هذه الأجهزة علما بأن هذه الطرق تعتمد إعتمادا كليا على مدى نقاء الـDNA المعزول من المادة النووية بالبكتريا لتحديد الفرق في التركيب الداخلي له، و لذا وجب التنوية إلى أن وجود بعض الأخطاء التجريبية الشخصية في طرق عزل و تنقية DNA قد يؤدي إلى نتائج مختلفة تماما عن الحقيقة فضلا عن أن هذه الطريقة تقدر DNA لكل من البكتريا سواء كانت حية أو ميّتة أو التي قد تكون قد فقدت نشاطها الحيوي و بذلك قد يختلط الأمر في تحديد هوية الكشف حيث أن البحث يكون بهدف تحديد الأعداد الميكروبية الحية و التي تؤدي إلى إستمرار أعراض العدوي و التسمم الغذائي أو الفساد الميكروبي للأغذية. و لذا فإن الطرق الميكروبيولوجية التقليدية المعملية تحدد و بدقة الميكروبات الحية و التي يمكن تتبع نموها و نشاطها و التفرقة بينها بإستخدام الطرق البيوكيميائية.

و يجب الإشارة أيضا أن أشتراط تطبيق نظام ISO 9000 في الأغذيـــة و هـــو يختـــص بمراقبـــة الجـــودة و أيضـــا نظام Hazard Analysis Critical Control Points (HACCP) "تحديد نقاط المراقبة الحرجة لتحليل المخاطر" و هو النظام الذي يختص

بالقررات الفنية التي تجري بهدف ضمان أمن و أمان المنتج الغذائي و هو أحد العناصر الأساسية و الرئيسية لأدارة الجودة الشاملة Total Quality Management (TOM) و الذي يحقق الممارسة التصنيعية الجيدة. و تطبيق هذه النظم سوف يفتح المجال للصناعات الغذائية المصرية و العربية لغزو الأسواق العالمية، علما بأن هذين النظامين أحد أضلاعها الأساسية هو الكشف عن العديد من الميكروبات المسببة للأمراض و العدوى و التسمم الغذائي و لذا تظهر أهمية إستخدام الطرق الميكروبيولوجية المعملية السليمة و المبنية على أسس علمية واضحة للكشف عن أثنين من أخطر الميكروبات التي يحملها الغذاء و تسبب العديد من الأعراض الممرضية للإنسان حينما يتناول هذه الأغذية.

و حتى يسهل تداول هذا الكتيب بين أيدي العديد من الباحثين و المهتمين بهذا المجال من العلم فقد زود بالعديد من البيئات الغذائية الأساسية و البديلة و تركيبها و الطرق المقترحة لضبط درجة حموضتها و تعقيمها فضلا عن وجود INDEX بنهاية هذا الكتيب مرتب هجائيا باللغة الإنجليزية يشتمل على جميع أسماء البيئات الغذائية المستخدمة و اسماء التجارب و الدلائل و أيضا أسماء الكائنات الحية الدقيقة المذكورة به.

و الله هو الموفق،،

المـــــؤلـــف

محتويات الموضوعات

الموضوع	رقم الصفحة
طرق الكشف وعد كل من السالمونيلا و الشيجيلا.	١٢
الموقع التقسيمي الحديث.	١٣
الصفات العامة لعائلة Enterobacteriaceae.	١٣
أهم الأجناس الواقعة تحت هذه العائلة.	١٤
- أولا: السالمونيلا ***Salmonella spp.***	١٤
- أهم الصفات.	١٤
- مصادر التلوث و أعراض الإصابة.	١٦
- ثانيا: الشيجيلا ***Shigella spp.***	١٨
- أهم الصفات.	١٨
- أعراض الإصابة.	١٩
طرق الكشف المعملي عن السالمونيلا و الشيجيلا.	٢١
- التنشيط المبدئي للعينة Pre-enrichment of sample	٢٣

٢٤	- تنشيط العينة Enrichment of sample.
٢٧	- الصب للعينة المنشطة Plating of enrichment.
٣٥	- الغربلة Screening.
٤١	- طرق الكشف عن تكون الأندول.
٤١	- إختبار ورق حمض الأوكساليك.
٤٢	- دليل كوفاك Kovac's reagent.
٤٢	- إختبار إيهليش - بوهيم Ehrilch – Boehime.
٤٤	- إختبارات التعرف Confirmation.
٤٩	طرق الصبغ بصبغة جرام.
٥٣	البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها في الكشف عن السالمونيلا و الشيجيلا خلال عمليات التنشيط و العزل و الغربلة و التعرف.
٥٥	1. Brain Heat In Infusion.
٥٦	2. Brilliant Green Agar (Mod.)
٥٧	3. Buffered Peptone water.

٥٧	4. Cooked Meat Medium.
٥٩	5. D.C.L.S. Agar.
٦٠	6. Desoxychiolate Citrate Agar. (HYNES).
٦٢	7. E.E. Broth.
٦٣	8. Endo Agar (Base).
٦٤	9. Hektoen Enteric Agar.
٦٥	10. Kligler Iron Agar.
٦٧	11. Kohn-Two-Tube Medium (KTTM).
٦٨	Medium No.1
٦٩	Medium No.2
٧٣	12. Lysine Decarboxylase Broth.
٧٤	13. Lysine Iron Agar.
٧٦	14. Muller – Kanffman Teterathionate Broth.
٧٧	15. Simmons Citrate Agar.
٧٨	16. XLD Medium.

الإختبارات البيوكيميائية للتعرف على السالمونيلا والشيجيلا.	٨١
١. إختبار إنتاج الأندول Indole production.	٨٣
٢. إختبار أحمر الميثايل Methyl Red test.	٨٥
٣. إختبار فوكس بروسكور Voges-Proskaur test.	٨٧
٤. إختبار Simmon's Citrate test.	٨٩
٥. إختبار إنتاج كبرتيد الهيدروجين Production of H_2S test.	٩١
٦. إختبار الحركة Motility test.	٩٤
٧. إختبار القدرة على النمو في وجود سيناليدالبوتاسيوم KCN growth test.	٩٦
٨. إختبار القدرة على إنتاج حامض و غاز من الجلوكوز Production of acid and gas from glucose.	٩٩
٩.إختبار تخمر السكريات المختلفة.	١٠٢
١٠. إختبار إختزال النترات Reduction of Nitrate.	١٠٤
المراجع	١٠٩
INDEX	١١٣

محتويات الجداول المرفقة

إسم الجدول	الصفحة
• جدول يوضح وصف لبعض المستعمرات البكتيرية التي تنمو على البيئات الغذائية المتخصصة للكشف عن السالمونيلا و الشيجيلا.	٣٣
• جدول يوضح كيفية التفرقة بين الأفراد التابعة للسالمونيلا و الشيجيلا بإستخدام بيئة TSIA في صورة butt, slant.	٣٩
• جدول يوضح كيفية التفرقة بين السالمونيلا و الشيجيلا و بعض سلالات عائلة Enterobacteriaceae بإستخدام إختبار SIM.	٤٣
• جدول الإختبارات البيوكيميائية للتعرف على كل من السالمونيلا و الشيجيلا و الأفراد التابعة لها.	٤٥
• جدول يوضح كيفية التفرقة بين الأفراد التابعة للشيجيلا.	٤٦
• جدول يوضح التفرقة بين بعض أجناس السالمونيلا و الشيجيلا على الأجار العميق و الأجار المائل و تكوين H_2S.	٦٧
• جدول التفرقة بين أجناس السالمونيلا و الشيجيلا بإستخدام بيئة (KTTM) No.1 and No.2.	٧٢
• جدول يوضح التفرقة بين أفراد السالمونيلا و الشيجيلا بفعل إزالة مجموعة الكربوكسيل لليسين.	٧٤
• جدول يوضح الأجناس التي تعمل على إزالة مجموعة الأمين من الحامض الأميني ليسين.	٧٥
• جدول يوضح قدرة بعض الأفراد التابعة للسالمونيلا و الشيجيلا على إنتاج غاز و حامض من الجلوكوز.	١٠٢

طرق الكشف و عد

كل من

السالمونيلا و الشيجيلا

Detection and Enumeration Methods of *Salmonella* and *Shigella spp.*

طرق الكشف و عد كل من السالمونيلا و الشيجيلا

Detection and Enumeration Methods of *Salmonella* and *Shigella spp.*

الموقع التقسيمي الحديث:

تقـــع كل من السالمونيـــــلا و الشيجيـــــلا تبعا لتقســـيم Bergery's Manual of Systematic Bacteriology (2001) vol 2 تحت Domain Bacteria و هي تتبع Phylum B XII (Proteobacteria) و الذي يشتمل على خمس classes.

و الصف الذي يحتوي على هذين الجنسين هو:

Class III: Gamaproteobacteria.

Order XII: Enterobacteriales.

Family I: Enterobacteriaceae.

و من الصفات العامة لأفراد هذه العائلة أنها:

١. لا هوائية إختيارا	facultative anaerobic
٢. سالبة لصبغة جرام	Gram negative
٣. عصوية	Rods

هذه الرتبة Order تشتمل على عائلة واحدة فقط هي العائلة السابقة و التي تشتمل على واحد و أربعون جنسا رئيسيا منها الـ*Salmonella* و الـ*Shigella*.

و من أهم الأجناس الواقعة تحت هذة العائلة و التي تكون ذات علاقة بفساد الأغذية أو تسبب عدوي أو أعراض مرضية نتيجة إنتاج سموم داخلية هي:

Family I: Enterobacteriaceae

Genus I : Escherichia

Genus X: Citrobacter.

Genus XII: Enterobacter.

Genus XIII: Erwinia.

Genus XVV: Klebsiella.

Genus XXVIII: Proteus.

Genus XXXII: Salmonella.

Genus XXXIII: Serrtia

Genus XXXIV: Shigella.

Genus XL: Yersinia.

أولا: السالمونيلا *Salmonella spp.*

أفراد هذا الجنس تعتبر واحدة من أهم البكتريات الواقعة تحت العائلة السابقة؛ و هذا الجنس يحتوي علي حوالي 1.200 serotypes .

و من أهم صفات أفرادها:

١. سالبة جرام Gram negative

٢. عادة متحركة Usually motile

٣. لا هوائية أختيارية Facultative anaerobic

٤. تكون مستعمرات يكون قطرها غالباً ما بين ٢-٤ ميللميتر عند نموها على البيئات المتخصصة.

٥. تختزل النيترات (NO_3^-) Nitrates إلي نيتريت (NO_2^-) Nitrites.

٦. عادة تكون غاز(gas) عند تخمر الجلوكوز D-glucose .

٧. عادة تنتج كبريتيد هيدروجين (H_2S) Hydrogen Sulfide عند تنميتها على بيئة Triple Sugar Iorn agar (TSI) ما عدا أغلب السلالات التابعة للـ *S.paratyphi A* .

٨. سالبة لأختبار الأندول Indole - negative

٩. تستطيع إستخدام السترات Citrate كمصدر وحيد للكربون، ماعدا بعض السلالات التابعة لكل من الـ*S.paratyphi A & S.typhi* .

١٠. لا تستطيع تخمر كل من الـ amygdalin, inositol, sucrose.

١١. لا تستطيع إنتاج إنزيمات الليبيز lipase are not produced.

١٢. لا تستطيع تخمر اللاكتوز ماعدا بعض السلالات التابعة للـ*S. arizonae* .

١٣. تستطيع تخمر الجلوكوز، المالتوز، المانيتول، السوربيتول و تنتج غاز.

١٤. تنمو جيدا في وجود الأوكسجين و أيضا في غياب الأوكسجين.

مصادر التلوث و أعراض الإصابة:

بعض الأفراد التابعة للسالمونيلا تكون مرضية pathogenic للإنسان و العديد من أفرادها يسبب أعراض مرضية لة عن طريق أنتقالها إلية عن طريق مجموعة من المواد الغذائية مثل الدجاج، البيض، اللحوم حيث تقوم بإفراز سمومها الداخلية endotoxins و يلزم ذلك دخول أعداد كبيرة من هذة الأفراد محمولة علي الغذاء داخل جسم الإنسان.

و يعتبر كل من الدواجن و البيض و العلائق الحيوانية و مصانع إنتاج و تربية الدواجن هي المصدر الرئيسي للتلوث بهذة البكتريا، و قد تكون كل من الحشرات و القوارض مصدر للتلوث بالسالمونيللا أيضا.

و تتواجد أفراد هذا الجنس في المياة، التربة، المجاري، علي الحيوان و الإنسان، مخلفات المصانع و الأغذية الحيوانية و العديد من المنتجات الغذائية و هي تتواجد طبيعيا في متبقيات أمعاء الحيوان و الإنسان.

هناك أفراد منها تسبب عدوى غذائية food infection حيث يؤدي ذلك إلى إحداث أنواع من الحمي مثل typhoid and paratyphoid fever و حيث تكون الأفراد المسببة لذلك محمولة عن طريق الغذاء food born salmonellosis، و وجد أن حمى التيفود Typhoid تسببها *Salmonella typhi* أما حمى البارتيفود Paratyphoid تسببها أفراد تابعة لكل من *S. paratyphi A* , *S. paratyphi B* , *S. paratyphi C*

و هناك أفراد أخري تابعة لهذا الجنس مثل *S. typhimurim*, *S. enteridis*, *S. javiana* تسبب عدوي مصحوبة بحالات مرضية تظهر في صورة مغص معوي للإنسان و حمى.

و من الملاحظات الجديـرة بالذكر أن كل من الأفـراد *S. typhimurim* *S. enteridis, S. javiana* تستطيع تحمل درجة حرارة التجميد حتى درجة حرارة – ٢٥,٥مْ و هذا لفترات طويلة تتراوح ما بين ٩٢ – ٢٧٠ يوم و هذا يعكس مدي خطورة بعض الأغذية المجمدة التي تحمل تلك الأفراد و التي يتناولها الإنسان دون معاملة حرارية.

أيضا وجد أن أفراد تابعة للـ *S. typhimurim* تستطيع أن تعيش في مدي واسع من درجات الحرارة و الذي يتراوح ما بين ٦,٢مْ و حتي ٤٥مْ.

و يلاحظ أن عملية البسترة للبن و التي تجري علي ١٥٠ف لمدة ١٢ دقيقة تكون كفيلة بقتل ٩٠% من أعداد هذة البكتريا، و إن إستخدام درجة حرارة ١٠٠مْ خلال عمليات السلق لمدة ١٠ دقائق تكون كفيلة بقتل أغلب أو كل أعداد الـ*Salmonella spp* في المادة الغذائية.

و تتمثل الخطورة الناتجة من هذة البكتريا ليست في الأغذية المطهية التي كانت تحتوي عليها و لكن في إعادة تلوثها مرة أخري من الأغذية الطازجة و الحاملة لها أو الأغذية الطازجة الملوثة بها و التي لم يجري لها معاملة حرارية كافية لقتلها حيث أنها تسبب الأعراض الخاصة بمرض الـSalmonellosis و هي تتمثل في ظهور الأعراض التالية:

١. الألم بالبطن.

٢. إسهال وقئ متكرر.

٣. خمول و إحساس بالبرودة.

و في حالات الإصابة الشديدة تظهر أعراض أشد خطورة و هي:

١. إنخفاض في عدد كريات الدم الحمراء.

٢. إلتهاب و تقيح بالأمعاء.

٣. هزال شديد يؤدي إلى الوفاه.

مع ملاحظة ظهور هذه الأعراض بسرعة بالنسبة للفئات الحساسة و هي الأطفال و الشيوخ و الحوامل و الناقهين للأمراض.

ثانيا: الشيجيلا *Shigella spp.*

عادة الأفراد التابعة للشيجيلا تكون مصاحبة للسالمونيلا، و يتواجد تابعا لهذا الجنس أربعة أفراد، و رغم التشابة الكبير بين صفات كل من السالمونيلا و الشيجيلا إلا أن الشيجيلا لها صفات مميزة.

أهم صفات الشيجيلا ما يلي:

١. عصوية مستقيمة	Straight rods
٢. سالبة الجرام	Gram negative
٣. غير متحركة	Non-motile
٤. لا هوائية أختيارا	Facultative anaerobic

٥. تخمر السكريات ماعدا اللاكتوز دون إنتاج غاز (ماعدا بعض الأفراد).

٦. لا تستطيع إستخدام السترات كمصدر وحيد الكربون.

٧. لا تنمو في بيئة تحتوي علي سيانيد البوتاسيوم KCN.

٨. لا تنتج كبريتيد الهيدروجينH_2S .

أعراض الإصابة:

و من الأفراد التابعة لهذا الجـنس هي *Sh. dysenteria, Sh. flexneri, Sh. boydii, Sh. Sonnei.* و هذة الأفراد هي التي تسبب مرض Shigellosis و أيضـا مرض الدوسنتريا الباسيلية bacillary dysentery بـواسطة *Sh. dysenteria* و هذا عن طريق إنتقالها إلي الإنسان عن طريق الغذاء الملوث بها.

و يلاحظ أن أفراد هذا الجنس تسبب أعراض مرضية للإنسان و ليس بالضرورة أن تكون الأعداد العالية منها مسبب لحدوث المرض بل يكفي أعداد قليلة جداً لتسبب ذلك و من هذه الأعراض:

١. الإسهال نتيجة مهاجمة النسيج المبطن لجدار الأمعاء.

٢. ظهور بزار دموي نتيجة إختراق و مهاجمة الأمعاء و الأوعية الدموية بها.

٣. الألام بالبطن و إلتهاب للغشاء البروتيوني.

طـرق الكشف المعملي

عــــن

السالمونيلا و الشيجيلا

طرق الكشف المعملي عن السالمونيلا و الشيجيلا

- طرق الكشف عن كل من *Salmonella* and *Shigella spp.* من الطرق التي يجب أن يتبع معها خطوات معينة مرتبة بطريقة تنظيمية، حيث يجب ألا تسبق خطوة .. خطوة أخري.
- أيضا في جميع الأحوال يجب أن يبدأ الأختبار بإستخدام ٢٥ جرام من العينة موضع الفحص و ذلك لأن جميع البيانات و التقارير تنص علي أن يكون العد محسوبا لكل ٢٥ جرام و هذة الخطوات كما يلي:

1. Pre-enrichment of sample.

2. Enrichment of sample.

3. Plating of enrichment sample.

4. Screening.

5. Confirmation.

1. Pre-enrichment of sample

هذة الخطوة تجري فقط مع العينة الغذائية التي تتواجد في الصورة الجافة dehydrated foods و الأغذية المجفدة freeze-dried و ذلك لإجراء التنشيط المبدئ لأغلب الأجناس التابعة للعائلة Entrobacteriaceae.

و عند الفحص يجب أخذ عينة ممثلة تمثل من ٢٠ جرام إلى ٣٠ جرام (single sample) أو عينتان يمثل كل منها ٢٥ جرام.

إلا أن The Food and Drug Administration(FDA) أوصت بأخذ ٤٠٠ جرام من كل لوط lot، بهدف إجراء التنشط المبدئي و هذا بوزن ٢٥ جرام من العينة الممثلة و تنقل إلي دورق سعة ٥٠٠ مل يحتوي علي ٢٢٥ مل من أحدي البيئات التالية ثم إجراء التحضين لمدة ٢٤ ساعة / ٣٥°م.

Lactose Broth /L		OR	**Nutrient Broth / 1 L**	
Beef extract	3g		Beef extract	3g
Peptone	5g		Peptone	5g
Lactose	5g			
pH = 6.7			pH = 6.8	
ster. 15p.p (121 °C)/15 min.			ster. 15p.p (121 °C)/15 min.	

2. Enrichment of sample

في حالة العينات الغذائية غير الجافة يتم التنشيط عن طريق نقل ٢٥ جرام من العينة موضع الفحص مباشراً إلي ٢٥٠ مل من إحدي البيئتين التاليين:

Teterathionate broth	24 h / 35 ± 1 °C
Selenite – Cystein – broth	24 h / 35 ± 1 °C

مع ملاحظة أنة يمكن نقل ١٠ مل أو ٢٠ مل من التحضير المبدئي السابق Pre-enrichment of sample إلي ١٠٠ مل من كل من البيئتين السابقتين

(١٠ مل تمثل ١ جرام ، ٢٠ مل تمثل ٢ جرام من العينة) و يجري التحضين لمدة ١٢ إلي ٢٤ ساعة علي درجة حرارة ٣٥مْ أو ٤٣مْ.

في الأغذية الغنية جداً بالمواد الدهنية يجب إضافة ٦ مل من محلول ١٠% Sodium heptadecyl sulfate (Tergitol No.7).

هاتين البيئاتان لا يجري تعقيمها في الأوتوكلاف و يكتفي فقط بإجراء إذابة مكونتها في الماء المغلي (أو المعقم) تحت ظروف معقمة.

Tetrathionate broth (Base) / 1 Liter

(Difco)		(Merck)	
Proteose peptone	5 g	Peptone from casein	2.5 g
Difco-Bile salt	1 g	Peptone from meat	2.5 g
Calcium carbonate	10 g	Bile salts mix.	1.0 g
Sodium thiosulfate	30 g	Calcium carbonate	10 g
		Sodium thiosulfate	19 g

في البيئات الجاهزة يتم نقل ٤,٦ جرام (Difco) أو ٣,٥ جرام (Merck) إلي ١٠٠ مل ماء مقطر (يمكن تعقيمة) و يجري التسخين للغليان بهدف إذابة مكونات البيئة؛ يجري التبريد بعد ذلك إلي أقل من درجة الحرارة ٤٥مْ و يضاف لكل ١٠٠ مل منها ٠,٢ مل محلول الأيودين* Iodine solution.

Iodine solution*:

Dissolving 6 gm iodine crystal with 5 gm potassium iodide in 20 ml water.

ملاحظات:

- يجب عدم إجراء تسخين البيئة بعد إضافة محلول الأيودين.
- يجب إستخدام البيئة في نفس اليوم بعد إضافة محلول الأيودين.

و يلاحظ أن محتوي هذة البيئة من الأملاح الصفراء bile salts تؤدي إلي تثبيط أو قتل مجاميع الكوليفورم coliform groups مع المحافظة علي إستمرار نمو كل من *S. typhi & S. paratyphi*.

أما البيئة الثانية التي يمكن إستخدامها في هذه الخطوة فهي:

Selenite Broth (Difco)		**Selenite Cystine Broth (Merck)**	
Tryptone	5 g	Peptone from casein	5.0 g
Lactose	4 g	L (-) cystine	0.01 g
Disodium phosphate	10 g	Lactose	4.0 g
Sodium selenite	4 g	Na_2HPO_4	2.0 g
		Sodium selenite	4.0 g
pH = 7		pH = 7 ± 0.2	

في البيئات الجاهزة يتم نقل ٢,٣ جرام (Difco) أو ١,٥ جرام (Merck) إلي ١٠٠ مل من الماء المقطر المعقم و يجري إذابة مكونات البيئة عن طريق التسخين لدرجة حرارة لا تزيد عن ٦٠ أو ٧٠ م°.

هذة البيئة تكون متخصصة في تشجيع نمو الـ*S. typhi* بالإضافة إلي مجموعة أخري من السالمونيللا حيث أن إضافة مركب sodium selenite يؤدي إلي تثبيط و إحداث تسمم لمجاميع fecal coli and enterococci إلي جانب

إختزال العديد الـــcolon bacilli خلال الـــ ٨ – ١٢ ساعة الأولي من التحضين و هي تعمل علي زيادة تنشيط typhoid bacilli إلا أن الأفـــراد تـــابعة للـــ*Proteus spp.* لا يحدث لها تثبيط.

يمكن تخزين هذة البيئة بعد التحضير في الثلاجة (+٤م) في مكان مظلم و يلاحظ أنة إذا تكون راسب أحمر لها أثناء فترة التخزين فيجب عدم إستخدامها.

أيضا من البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها في تنشيط enrichment كل من السالمونيلا و الشيجيلا البيئات التالية :

- **Buffered Peptone Water.**
- **EE Broth.**
- **Muller – Kauffman Tetrathionate Broth.**

3. Plating of enrichment sample

في هذة الخطوة يتم نقل ١ مل من تحضير Enrichment of sample إلي واحدة من أحدى البيئات الغذائية الثلاث الأتية:

- **Bismith Sulfate Agar (Not sterilized)**
- **S.S: Agar (Not sterilized)**
- **Brilliant - green Phenol-red Lactose Agar.**

و يتم التحضين علي درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ إلي ٢٤ ساعة، حيث يمكن بإستخدام كل واحدة من هذة البيئات الغذائية تميز المستعمرات الخاصة ببعض سلالات السالمونيلا و الشيجيلا و بعض السلالات البكتيرية الأخري الواقعة تحت عائلة Enterobacteriaceae.

Bismith Sulfate Agar (B.S.A)/ 1 Liter

(Difco)		(Merck)	
Beef-extract	5 g	Meat extract	5 g
Peptone	10 g	Special peptone	10 g
Dextrose	5 g	D (+) glucose	5 g
Disodium phosphate	4 g	Disodium phosphate	4 g
Ferrous sulfate	0.3 g	Iron (II) sulfate	0.3 g
Bismith sulfite	8 g	Bismith sulfite	8 g
Brilliant green	0.025 g	Brilliant green	0.025 g
Agar	20 g	Agar – agar	15 g
PH = 7.7		pH = 7.6 ± 0.1	

هذه البيئة تكون متخصصة للكشف عن البكتريا المسببة لحمى التيفويد *S. typhi* و عزل بعض السالمونيلاالأخري.

و وجود دليل Brilliant green في هذه البيئة يعمل على تثبيط جميع البكتريا الموجبة لجرام و أيضا إيقاف نمو كل من *Proteus sp.* و Coliform groups و يساعد على ذلك وجود مركب الـــbismith إلا أن مركب

الـــsulfate الذي يدخل في التركيب السابقة يتم إختزاله بواسطة البكتريا التي تملك القدرة على ذلك ليتكون الـــsulfide، حيث تتكون في هذه الحالة مستعمرات بكتيرية ذات مركز أسود أو مستعمرات بكتيرية سواء ذات حافة خارجية سوداء نتيجة تكوين iron sulfide.

في البيئات الجاهزة يتم إذابة ٥,٢ جرام (Difco) أو ٤,٧ جرام (Merck) في ١٠٠ مل ماء مقطر معقم في دوارق زجاجية و ظروف معقمة أو يترك لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة الغرفة يلي ذلك إستخدام درجة حرارة الغليان حتى الذوبان الكامل حيث لا يستخدم الأتوكلاف في تعقيم هذه البيئة، و يجب ألا تزيد فترة تخزين هذه البيئة بعد تحضيرها عن أربعة أيام على درجة حرارة +٤م° لأن غير ذلك يؤدي إلىإختزال المواد الفعالة التي تنشط البكتريا السابق الإشارة لها.

Salmonella and Shigella Agar (S.S.A) / 1 Liter

(Difco)		(Merck)	
Beef extract	5 g	Meat extract	5 g
Proteose peptone	5 g	Special peptone	5 g
Lactose	10 g	Lactose	10 g
Bile salts No3	8.5 g	Ox bile dried	8.5 g
Sodium citrate	8.5 g	Sodium citrate	10 g
Sodium thiosulfate	8.5 g	Sodium thiosulfate	8.5 g
Ferric citrate	1 g	Iron (III) citrate	1 g
Brilliant green	0.00033 g	Brilliant green	0.0003 g
Neutral red	0.025 g	Neutral red	0.025 g
Agar	13.5 g	Agar – agar	12 g
pH = 7		PH = 7 ± 0.1	

في البيئات الجاهزة يتم نقل ٦ جرام من مكونات (Difco) أو(Merck) إلى١٠٠ مل ماء مقطر معقم و يترك لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة الغرفة يلي ذلك إستخدام درجة حرارة الغليان حتى تمام الذوبان الكامل مع إجراء عملية الرج، بعد تمام الذوبان يجب أن تبرد سريعا قبل أن تصب في الأطباق، هذه البيئة لا يجري تعقيمها في الأوتوكلاف لأن ذلك يؤدي إلى تحطيم مكوناتها الفعالة، يتم تحضيين هذه البيئة مع محضر enrichment of sample على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ إلى ٢٤ ساعة، و يمكن تخزين البيئة المحضرة لمدة أسبوع واحد في الثلاجة.

مكونات هذه البيئة من Brilliant green و الـ Bile salts تستطيع إيقاف جميع البكتريا الموجبة لجرام، بينما مجموعة الـ coliform فيحدث لها تثبيط و نظرا لوجود Sodium thiosulfate الذي يتفاعل مع سترات الحديد (ferric citrate) مكونا بذلك مركب الـsulfide و الأخير هذا يعمل على إظهار المستعمرات ذات لون أسود نتيجة قدرتها على إختزال الـsulfite إلى sulfide.

وجود سكر اللاكتوز lactose فى مكونات هذه البيئة يستخدم للتفرقة بين البكتريا التي لا تستطيع تخمره، (السالمونيلا و الشيجلا) و البكتريا التي تستطيع تخمره مثل مجموعة الـcoliform groups ليتكون بذلك حامض يتفاعل مع دليل neutral red لتتكون مستعمرات تتراوح لونها بين الأحمر إلىالقرمزي و يلاحظ أن بيئته S.S agar من البيئات الإختيارية المستخدمة في التفرقة بين كل من *Salmonella & Sigella* و البكتريات الأخرى حيث أن كل من السالمونيلا و الشيجيلا يظهرا في صورة مستعمرات شفافة أو ذات شفافية غير ملونة ذات مركز أسود.

Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLSA)/1L

BPLSA (Merck)

Special peptone	10 g
Meat extract	5 g
Lactose	10 g
Sucrose	10 g
Sodium chloride	3 g
Disodium hydrogen phosphate	2 g
Phenol red	0.08 g
Brilliant green	0.0125 g
Agar-agar	12 g

pH = 6.9 ±± 0.1

تحضر هذه البيئة عن طريق إذابة ٥,٢ جرام من مكوناتها في ١٠٠ مل ماء مقطر يكون على درجة حرارة الغليان ثم تعقم في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة ١٢١م.

Brilliant Green Agar (BGA) / 1 Liter

BGA	(Difco)
Yeast extract	3 g
Proteose peptone	10 g
Sodium chloride	5 g
Lactose	10 g
Sacchrose	10 g
Phenol red	0.08 g
Brilliant green	0.0125 g
Agar	20 g

pH = 6.9

تحضر هذه البيئة عن طريق إذابة ٥,٨ جرام من مكوناتها في ١٠٠ مل ماء مقطر و يجري إذابة هذه المكونات في حمام مائي يغلي حتى الذوبان، يجري التعقيم في الأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة على درجة حرارة ١٢١م.

تستخدم هذه البيئة مع محضر الـــenrichment of sample و هذا بالتحضين على درجة حرارة ٣٧م لفترة تتراوح ما بين ١٦ إلى٢٤ ساعة.

أيضا تكون وظيفة الـــbrilliant green هي إيقاف و تثبيط نمو مجموعة الـــcoliform، فضلاً عن أن السالمونيلا لا تملك القدرة على تخمر كل من السكروز و اللاكتوز لذا فإن إضافة السكروز هنا بهدف إلى إضعاف البكتريا ذات القدرة على إحداث تخمر اللاكتوز، هذه البيئة تكون متخصصة للتفرقة بين

الـ*salmonella spp.* عن *S. typhi.* مع ملاحظة أن كل من السلالات التابعة الـ*Shigella* لا تستطيع النمو على هذه البيئة.

و يلاحظ أنه إذا تواجدت بكتريا تملك القدرة على تخمر كل من السكروز و اللاكتوز فإن مستعمراتها تتميز بتكوين لون يتراوح ما بين الأصفر و الأخضر مع إحاطتها بهالة من نفس اللون بينما السالمونيلا و هي سالبة لتخمر اللاكتوز تكون مستعمرات يتراوح لونها ما بين القرمزي إلى الأحمر و تكون محاطة بهالة حمراء، أما إذا تواجدت سلالات من الـ*Proteus spp.* فربما تكون مستعمرات ذات لون أحمر.

الجدول التالي يوضح وصفا لبعض المستعمرات البكتيرية التي تنمو على إحدى البيئات الغذائية الثلاث المستخدمة في النظام الـPlating.

Microorganisms	Characteristics of colonies on media		
	B.S.A	S.S.A	BPLSA
Salmonella spp.	(١) مستعمرات رائقة ذات مركز أسود محاطة بواسطة حافة معدنية.	مستعمرات عديمة اللون أو شفافة ذات نفاذية و مركز أسود.	(٢) مستعمرات قرمزية إلى أحمر تحاط بواسطة هالة حمراء.
Shigella spp.	معظمها لا تنمو على هذه البيئة ماعدا سلالة *Sh. flexneria* حيث تكون مستعمرات لامعة لونها ما بين الأسود إلى الأخضر.	مستعمرات عديمة اللون أو شفافة	لا تنمو على هذه البيئة.

Microorganisms	Characteristics of colonies on media		
	B.S.A	S.S.A	BPLSA
Echerichia coli.	مستعمرات حمراء إلى قرمزي.	عادة لا تنمو.	(٣) مستعمرات صفراء مخضرة تحاط بهالة من نفس اللون.
Enterobacter aerogenes.	مستعمرات أكبر من *E. coli* لونها قرمزي إلى أبيض كريمي مخاطية.	عادة لا تنمو.	
Salmonella typhi.	ذات سطح أسود و حافة ذات لون أسود أو بني مسود قطرها يتراوح ما بين ١-٤ ملم.	-	لا تنمو على هذه البيئة.
S. paratyphi. B,* and *S. enteritidis.	تنمو بغزارة مكونة سطح أسود رطب moist	-	-
Proteus spp.	مستعمرات خضراء إلى بنية مخاطية.	شفافة ذات مركز أسود	مستعمرات حمراء

١. ماعدا البكتريا *S. paratyphi A.* and *S. pullorum.*

٢. السالمونيلا التي لا تملك القدرة على تخمر اللاكتوز.

٣. تملك القدرة على تخمر اللاكتوز والسكروز و يتبعها أيضا *Proteus vulgaris*

أيضا من البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها في عزل isolation كل من السالمونيلا و الشيجيلا البيئات التالية:

Brain Heat Infusion.

Brilliant Green Agar (Modified).

Cooked Meat Medium.

DCLS Agar.

Desoxycholate Citrate Agar (Hynes)

EE broth.

Endo Agar Base.

Hektoen Enteric Agar.

Nutrient Broth.

XLD Medium.

4. Screening

تتم عملية الغربلة screening لبعض المستعمرات النامية على إحدى البيئات السابقة في خطوة الـــpanting و هذا بهدف التفرقة بين كل من السالمونيلا و الشيجلا و بعض أجناسها و ذلك بإستخدام العديد من البيئات الغذائية و التي من أشهرها البيئتان التاليتان:

I. Triple – Sugar Iron Agar (TSIA).

II. SIM Culture Medium (SIM)

I. Triple – Sugar Iron Agar (TSIA).

(TSIA) /1 Liter (Difco)		(TSIA) /1 Liter (Merck)	
Beef extract	3 g	Meat extract	3g
Yeast extract	3 g	Yeast extract	3g
Peptone	15 g	Peptone from casein	15g
Proteose peptone	5 g	Peptone from meat	15g
Lactose	10 g	Lactose	10g
Sacchrose	10 g	Sucrose	10g
Dextrose	1 g	D (+) Glucose	1g
Ferrous sulfate	0.2 g	Ammonium iron III citrate	0.5g
Sodium chloride	5 g	Sodium chloride	5g
Phenole red	0.024 g	Phenol red	0.024g
Agar	12 g	Agar – agar	12g
Sodium thiosulfate	0.3 g		
pH = 7.4		pH = 7.4 ± 0.1	

عند توفر البيئة الجاهزة يتم نقل ٦,٥ جم من مكونات (Difco) أو نفس الوزنة من (Merck) إلى١٠٠ مل ماء مقطر بارد و يجري التسخين في حمام ماني يغلي حتى الذوبان ثم تعقم على درجة حرارة ١٢١مْ (١٥ رطل/بوصة) لمدة ١٥ دقيقة، يمكن عمل slant مائل منها أو أجار عميق و هذا عن طريق توزيعها داخل أنابيب في الصورة slant بإرتفاع ٣ سم، أو أجار عميق deep بإرتفاع ٣ سم.

هذه البيئة تستخدم للتعرف على البكتريا السالبة لجرام و المرضية و هي من البيئات المتخصصة للتفرقة بين كل من السالمونيلا و الشيجيلا النامية على إحدى البيئات **BSA or SSA or BPLSA** .

تحتوي هذه البيئة على ثلاث سكريات هي السكروز و اللاكتوز و الجلوكوز في وجود دليل أحمر الفينول Phenol red و بذلك فهي تفرق بين البكتريا التي تملك القدرة على تخمر إحدى هذه السكريات الثلاثة ليتكون حامض ليغير لون دليل البيئة من الأحمر إلىاللون الأصفر و أيضا الكشف عن البكتريا التي تكون غاز نتيجة تخمر إحدى هذه السكريات.

و يلاحظ أن كل من السالمونيلا و الشيجيلا يستطيعا تخمر الجلوكوز فقط ليتحول لون المنطقة التي يجري تلقيحها بالإبرة على الأجار العميق إلىاللون الأصفر نتيجة تكون حامض، و حيث أن السالمونيلا تستطيع إنتاج غاز بتخمر الجلوكوز بينما الشيجيلا لا تستطيع تكوين غاز نتيجة تخمر الجلوكوز فأنه يمكن ملاحظة ذلك في منطقة التلقيح للأجار العميق.

و يجب إستخدام التقليح العميق بالإبرة Butt مع السالمونيلا و الشيجيلا لأنهم من البكتريا اللاهوائية إختياري و حيث أنهما قد يعطيا نتائج سالبة عند إستخدام الـــslant.

إستخدام السكريات الأخرى (اللاكتوز و السكروز) يكون بهدف الكشف عن بعض البكتريا الأخرى التي تستطيع تخمره و تكون حامض و هي التي تتبع بعض أفراد العائلة Fam.: Enterobacteriaceae.

أيضا محتوى هذه البيئة من الأملاح sulfate و الـــthiosulfate (Difco) تكون بهدف التفرقة بين السالمونيلا التي تستطيع إختزالة و تكون الـــsulfide ذو اللون الأسود عند إتحاده مع الشق المعدني للحديد فتظهر مستعمراتها سوداء اللون بالمقارنة بالشيجيلا التي لا تملك القدرة على ذلك أو تحتوي البيئة على (Merck) ammonium iron citrate الذي يتفاعل مع H_2S المنتج بواسطة السالمونيلا بالمقارنة بالشيجيلا التي تفتقر إلى ذلك فتظهر مستعمرات السالمونيلا باللون الأسود نتيجة تكون الـــsulfide.

الجدول التالي يوضح كيفية التفرقة بين الأفراد التابعة للسالمونيلا و الشيجيلا عند إجراء التلقيح على بيئة TSIA في صورة slant أو butt .

Species	Butt	Slant	H_2S production
Salmonella typhi.	A	OAI	+ butt with ring formation
S. paratyphi A	AG	OAL	-
S. pullorum.	AG	OAL	± butt black
S. paratyphi. B	AG	OAL	+ butt black
S. typhimurium.	AG	OAL	+ butt black
S enteritidis.	AG	OAL	+ butt black
Shigella dysenteriae.	A	OAL	-
Sh. flexneria.	A	OAL	-
Escherichia coli.	AG	A	-
Enterbacter aerogenes.	AG	A	-
Proteus vulgaris.	AG*	A*	(+)

A = color change to yellow, due to acid production.

AG = color change to yellow and gas production.

OAL = no change in the original color of the medium.

AG* = some strains may be without gas production.

A* = on two-sugar iron agar.

+ = Blackening due to H_2S production.

- = no blackening.

(+) = dirty , black-green.

II- SIM Cullture Medium (SIM)/1 Liter

SIM (Difco)		SIM (Merck)	
Beef extract	3 g	Peptone from meat	6.6 g
Peptone	30 g	Peptone from casein	20 g
Peptonized Iron	0.2 g	Amm. Iron III citrate	0.2 g
Sodium thiosulfate	0.025 g	Sodium thiosulfate	0.2 g
Agar	3 g	Agar-agar	3 g
pH= 7.3		pH = 7.3 ± 0.1	

يجري تحضير هذه البيئة بإذابة ٣,٦ جم (Difco) أو ٣ جم (Merck) في ١٠٠ مل ماء مقطر بارد مع إجراء التسخين في حمام مائي يغلي حتى تمام الذوبان، يتم توزيع هذه البيئة في أنابيب إختبار بإرتفاع قدره ٤سم، و يجري التعقيم في الأوتوكلاف على درجة حرارة ١٢١مْ (١٥ رطل / بوصة٢) لمدة ١٥ دقيقة.

بعد تحضير هذه البيئة يتم غرز لمسة من إحدى المستعمرات المختبرة بإستخدام إبرة التلقيح المدببة و يجري تحضين البيئة الملقحة لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة على درجة حرارة ٣٧مْ.

إذا كانت البكتريا من النوع المتحرك motility يتكون عكارة turbidity حول منطقة خط التلقيح العميق نتيجة تحرك البكتريا.

إذا كانت البكتريا منتجة لكبرتيد الهيدروجين H_2S يتكون لون أسود blackening أيضا حول المنطقة خط التلقيح.

و للكشف عما إذا كانت البكتريا منتجة للأندول Indole من عدمه يمكن إستخدام أحد الإختبارات التالية:

أ. إختبار ورق حمض الأوكساليك Oxalic acid paper test.

ب. دليل كوفاك. Kovac's reagent.

ج. إختبار إيهليش – بوهم. Ehrlich-Boehme test.

يسبق ذلك نقل لمسة من المستعمرة البكترية من إحدى البيئتين السابقتين إلى محلول tryptone water (١%) و يجري التحضين لمدة ٤٨ ساعة على درجة حرارة ٣٧ْم.

<u>طرق الكشف عن تكون الأندول Indole:</u>

أ) <u>لختبار ورق حمض الأوكساليك:</u> يطلق على هذا الإختبار إسم (إختبار جنيزدا Genezda test) يتم غمر شرائح من ورق الترشيح في محلول مشبع من حمض الأوكساليك oxalic acid و يجري تجفيف هذا الورق في الهواء.

يتم الإختبار عن طريق تعليق شرائح هذا الورق على فواهه جدار أنبوبة الإختبار و المحتوية على الـــtyptone water و الملقحة ببكتريا عمر ٤٨ ساعة و تغلق الأنبوبة جيد و تحضن لفترة ١٨ ساعة.

عند تحول لون الورق إلىال pink يعطي دلالة موجبة على إنتاج الأندول مع ملاحظة عدم حدوث تلامس البيئة مع ورق حمض الأوكساليك.

ب) دليل كوفاك Kovac's reagent :

يحضر دليل كوفاك بإذابة ٥ جرام من p-dimethyl aminobenaldhyde في ٧٥ مل كحول إيميلamyl alcohol، حيث يضاف إليها بعد ذلك ٢٥ مل من حمض الأيدوروكلوريك المركز.

يتم الإختبار بنقل من ٠,٢ – ٠,٣ مل من محلول كوفاك إلىأنبوبة إختبار تحتوي على معلق البكتريا المختبر في (1%) typhone water (عمر ٤٨ ساعة/ و يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧ م).

عند تكون لون أحمر قائم على الطبقة السطحية يعطي ذلك نتيجة موجبة لإنتاج الأندول، و بقاء لون المحلول بحالته الطبيعية (أصفر) يعطي نتيجة سالبة لإنتاج الأندول.

جـ- إختبار ايهليش-بوهيم Ehrlich-Boehime test

يتم هذا الإختبار عن طريق تحضير محلولين

المحلول رقم (I): يذاب ١ جرام من p-dimethyl aminobenaldhyde في ٩٥ مل كحول إيثيل (٩٥%) و يضاف إليهم ٢٠ مل من حمض الإيدروكلوريك المركز.

المحلول رقم (II): يتكون محلول مشبع من potassium persulfate

يتم الإختبار عن طريق إضافة ٥ مل من محلول (I) و ٥ مل من محلول (II) إلى ١٠ مل من معلق البكتريا المختبرة في tryptone water (١%) عمر ٤٨ ساعة و المحضنة على ٣٧ م مع الخلط الجيد.

عند تحول لون البيئة إلىاللون الأحمر بعد مرور ٥ دقائق يعطي نتيجة موجبة للبكتريا المنتجة للأندول.

و يمكن إتمام هذا الإختبار مع المستعمرات النقية المنماة على البيئات المستخدمة في خطوة الـscreening و ذلك عن طريق نقلها إلىأنبوبة إختبار تحتوي على tryptone water (١%) و ترج جيدا مع حوإلي ٥ مل من محلول (I) يلي ذلك إضافة محلول (II) نقطة نقطة على جدار الأنبوبة.

تكون لون قرمزي يميل إلىالأحمر ما بين الطبقتين الفاصلتين و بعد مرور ٥ دقائق يعطي نتيجة موجبة لإنتاج الأندول.

و يلاحظ أنه إذا تلونت الطبقة الفاصلة هذه بعد مرور فترة زمنية أكبر من ٥ دقائق يكون هناك شك بأن النتيجة موجبة.

و الجدول التالي يوضح كيفية التفرقة بين السالمونيلا و الشيجيلا و بعض سلالات عائلة Enterobacteriaceae بإستخدام إختبار SIM

Organisms	Mobility	H_2S	Indole
Salmonella typhi	+	+ or -	-
Salmonella spp.	+	+	-
Shigella spp.	-	-	+ or -
E. coli	+ or -	-	+
Klebisiella spp.	-	-	-
Enterobacter spp.	+	-	-
Citrobacter spp.	+	+	-

و أيضا من البيئات الغذائية التي يمكن استخدامها في خطوة الـ screening بهدف التعرف identification على كل من السالمونيلا و الشيجيلا البيئات التالية:

Hektoen-Enteric Agar.

Kliger- Iron Agar.

Kohn Two-Tube Medium.

Lysine Decarboxylase Broth.

Lysine Iron Agar.

Simmon's Citrate Agar.

Tryptone Water.

5. confirmation:

من إحدى الإختبارات الهامة المستخدمة في التعرف و التفرقة بين السلالات التابعة للسالمونيلا و السلالات التابعة للشيجيلا و هي إختبارات الـbiochemical assay و سوف يجري توضيح تركيب البيئات المستخدمة في ذلك و التفاعلات الدالة على الإختبارات و الأساس العلمي لها و ذلك بعد عرض هذه الإختبارات من خلال الجدول التالي:

Biochemical identification of *Salmonella* and *Shigella spp.*

Characteristics	*S I*	*S II*	*S III arizona*	*S IV*	*S. paratyphi A*	*S. typhi*	*Sh. dysenteria*	*Sh. flexneria*
Indole production	-	-	-	-	-	-	d	d
Methyle red	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-proskauer	-	-	-	-	-	-	-	-
Simmon's Citrate	+	+	+	+	-	-	-	-
H_2S on TSIA	+	+	+	+	+	+	-	-
Mobility	+	+	+	+	+	+	-	-
KCN, growth in	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Glucose:								
acid production	+	+	+	+	+	+	+	+
gas production	+	+	+	+	+	-	-	-
Fermentation of:								
Lactose	-	-	d	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	d	d
L-Arabinase	+	+	+	+	+	-	d	d
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	d
Maltose	+	+	+	+	+	+	[-]	d
$NO_3^- \longrightarrow NO_2^-$	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : 90-100% **strains are positive.**

d: 26-75% **strains are positive.**

[-]: 11-25% **strains are positive.**

-: 0-10% **strains are positive.**

* Data are calculated for 28 hrs incubation period at 36°C ± 1°C for all species.

و يمكن التفرقة بين الأجناس الأربعة التابعة للـ Shigella spp من خلال الجدول التالي:

Differential characteristics of the species of genes *Shigella*:

characteristics	*Sh. dysenteria*	*Sh. flexneria*	*Sh. boydii*	*Sh. sonnei*
Acid form:				
Lactose	-	-	-	+
Mannitol	-	+	+	+
Raffinose	-	d	-	+
Sucrose	-	-	-	+
Xylose	-	-	d	-
Indole production	d	d	d	-

ملحـــــــق

لطريقة الصبغ بجرام Gram's staining method و تركيب بعض البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها مع كل من السامونيلا و الشيجيلا في عمليات.

التنشيط	Enrichment
و العزل	Isolation
و الغربلة	Screening
و التعرف	Identification

مع وصف للمستعمرات المختبره و توضيح خواصها.

طريقة الصبـــغ بجـــرام

Gram's staining method

- طريقة الصبغ بجرام هي إحدى طرق الصبغ المزدوج و التي تستخدم مع أغلب أنواع البكتريا بهدف الفحص و التعرف المبدئي على البكتريا و هذا عن طريق الصبغ الأول بمحلول الكريستال البنفسجي crystal violet solution و إجراء المعامـــلة بمحلول اليـــود iodine solution ثم غسيل الغشاء البكتيري المثبت بواسطة الكحول أو الأسيتون فإذا لم تزال هذه الصبغة تكون البكتريا موجبة لجـــرام Gram positive حيث تظهر بالفحص الميكروسكوبي باللون القرمزي purple، بينما إذا أزيلت هذه الصبغة بإجراء معاملة الغسيل فهي تصبغ بلون الصبغة العسكية المستخدمة و هي أما محلول السفرنين safranin solution أو فوكسين الكربول Carbol fuchsin و بالتالي تصبح هذه البكتريا سالبة لجرام Gram negative حيث تظهر باللون الأحمر الوردي pink.

- يلاحظ فحص البكتريا النامية على العينات الغذائية خلال ١٨ – ٢٤ ساعة نظرا لحدوث تغيرات مورفولوجية في البكتريا إذا تقدم العمر عن ذلك مؤديا إلى إعطاء نتائج غير صحيحة.

التطبيـــق:

١. يجري تحضير غشاء بكتيري مثبت حراريا من أحد المستعمرات النقية المختبرة لا يتجاوز عمره ١٨ – ٢٤ ساعة.

٢. يصبغ بوضع نقط من محلول الكريستال البنفسجي و يترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ١ – ٢ دقيقة.

٣. تزال هذه الصبغة بالماء الجاري بسرعة و يضاف إلى نفس الغشاء البكتيري نقط من محلول اليود و يترك لمدة ١ دقيقة.

٤. يزال اليود و تغمر الشريحة في محلول كحول إيثايل ٩٥ % حتى تمام إزالة صبغة كريستال البنفسجي (يكون الغمر لفترة تتراوح ما بين ٥ – ١٥ ثانية تقريبا.

٥. يجري الصبغ بواسطة الصبغة العكسية و هي محلول السفرنين أو فوكسين الكربول لمدة ٢٠ ثانية.

٦. يجري غسيل بقية آثار الصبغة بالماء الجاري و تجفف و تفحص بالعدسة الزيتية.

المحاليل المستخدمة:

1. Crystal violet solution:

Crystal violet	0.5 gm
Dist. Water	100 ml

2. Gram Iodine solution:

Iodine	1.0 gm
Potassium iodide	2.0 gm
Dist. Water	300 ml

3. Safranin solution:

Safranin	0.25 gm
Dist. Water	100 ml

4. Carbol Fuchsin solution:

Ziehl-Neeisen's Carbol fuchsin*	10 ml
Dist. Water	150 ml

*** Ziehl-Neeisen's Carbol fuchsin**

Basic fuchsin	1.0 gm
Ethanol 95%	10 ml
Phenol 5% aqueous sol.	100 ml

البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها في الكشف عن السالمونيلا و الشيجيلا خلال عمليات enrichment و العزل isolation و الغربلة screening و التعرف identification

البيئات الغذائية التي يمكن إستخدامها في الكشف عن السامونيلا والشيجيلا خلال

عمليات enrichment و العزل isolation

والغربلة screening والتعرف identification

1. Brain Heat Infusion:

FORMULA:	gm/liter
Calf brain infusion solids	12.5
Beef heart infusion solids	5.0
Protease peptone	10.0
Dextrose	2.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	2.5

pH = 7.4 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/ 15 mins

- من البيئات المستخدمة في عمليات العزل.

2. Brilliant Green Agar (Modified):

FORMULA	gm/liter
"Lab-Lemco" powder	5.0
Peptone	10.0
Yeast extract	3.0
Disodium hydrogen phosphate	1.0
Sodium dihydrogen phosphate	0.6
Lactose	10.0
Sucrose	10.0
Phenol red	0.09
Brilliant green	0.0047
Agar	12.0

pH = 6.9 ± 0.2

DO NOT AUTOCLAVE.

Mix well and pour in plates.

خواص المستعمرات المختبرة:

- *Salmonella sp.*: تظهر كمستعمرات حمراء ذات حواف حمراء لامعة.
- عند تخمر اللاكتوز أو السكروز تتكون مستعمرات صفراء إلى خضراء.
- *Proteus sp.*: غالبا تثبط تماما وإذا نمت تعطي مستعمرات حمراء غير متجمعة.
- *Pseudomonas sp.*: يثبط نموها قليلا و إذا نمت تعطي مستعمرات حمراء.

3. Buffered Peptone Water:

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	3.5
Pot. dihydrogen phosphate	1.5

pH = 7.2 ± 0.2

Sterilize by autoclaving 121°C for 15 minutes.

• من أحد البيئات المستخدمة في عملية التنشيط.

4. Cooked Meat Medium:

FORMULA	gm/liter
Heat muscle	10.0
Peptone	10.0
"lab Lemco" powder	5.0
Sodium chloride	2.0
Dextrose	

pH = 7.2 ± 0.2

Sterilize by autoclaving 121°C for 15 minutes.

• من أحد البيئات المستخدمة في عملية العزل.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- يجري تعبأة هذه البيئة في أنابيب إختبار و يجب عدم إستخدامها في نفس يوم التحضير.
- قبل إستخدامها يجب أن تنقل إلى حمام مائي على درجة حرارة ١٠٠م لمدة ١٥ دقيقة و هذا لإزالة و إذابة الأوكسجين، و تبرد قبل إستخدامها.
- عند وجود بعض الكائنات الحية الدقيقة المحللة للسكريات sacchrolytic organisms اللاهوائية يؤدي هذا إلى تكون حامض و غاز بسرعة دون حدوث هضم لأحد مكونات البيئة و هي عضلات القلب.
- عند وجود بعض الكائنات الحية الدقيقة المحللة للبروتين Proteolytic organism اللاهوائية يؤدي هذا إلى تحلل لعضلات القلب مع تكوين لون أسود نتيجة إنطلاق H_2S و قد تحدث هذه الظاهرة مع بعض الـــSacchrolytic strains و لكن بدرجة قليلة.

5. D.C.L.S. Agar:

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Sodium citrate	10.5
Sodium thiosulphate	5.0
Lactose	5.0
Sucrose	5.0
Sodium desoxycholate	2.5
Neutral red	0.03
Agar	12.0

pH = 7.2 ± 0.2

DO NOT Autoclave.

• من أحد البيئات المتخصصة في عزل السالمونيلا و الشيجيلا.

6. Desoxychlotae Citrate Agar (HYNES):

FORMULA	gm/liter
"Lab lemco" powder	5.0
Peptone	5.0
Lactose	10.0
Sodium citrate	8.5
Sodium thiosulphate	5.4
Ferric citrate	1.0
Sodium desoxycholate	5.0
Neutral red	0.02
Agar	12.0

pH = 7.3 ± 0.2

DO NOT Autoclave or Remelt.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- تصب هذه البيئة في أطباق بتري و يجري التحضين على حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ إلى ٢٤ ساعة.
- عادة لون البيئة يكون قرمزي باهت pale pink و إذا نمت مستعمرات لها القدرة على تخمر اللاكتوز تكون ذات لون قرمزي محاطة برواسب من حامض desoxychloic.
- عادة هذه البيئة تثبط من نمو *E.coli*.

- ***Shigella Sonnei***: تكون مستعمرات قطرها ١ مم بعد ١٨ ساعة و يصل قطرها إلى ٢ مم بعد ٣٨ ساعة و هي مستعمرات ناعمة عديمة اللون.
- ***Shigella flexneria***: تكون مستعمرات شبيهه بالـ*Sh. Sonnei* و لكنها تكون ذات مركز مرتفع "ذو قبة dome".
- ***Salmonella paratyphi B***: تكون مستعمرات قطرها ١ مم بعد ١٨ ساعة يصل إلى ٢-٤ مم بعد يومين من التحضين ذات إرتفاع و مركز في صورة نقطة سوداء central black dot.
- ***Salmonella typhi***: تكون مستعمرات قطرها ½ إلى ١ مم بعد ١٨ ساعة بعد مرور يوم واحد يصبح القطر ٢ مم و هي عديمة اللون ذات مركز في صورة نقطة رمادية.
- ***Proteus sp.***: مستعمرات لامعة غالبا شفافة مع وجود مركز كبير به نقطة سوداء و تميل المستعمرات إلى الرائحة السمكية fish odour.

7. EE Broth:

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Dextrose	5.0
Disodium hydrogen phosphate anhyd.	6.45
Pota dihydrogen phosphate	2.0
Ox Bile purified	20.0
Brilliant green	0.135

pH = 7.2 ± 0.2

DO NOT Autoclave.

- من البيئات المستخدمة في عملية التنشيط.
- و يجري التحضين على درجة حرارة ٣٠°م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

8. Endo Agar: (Base)

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Lactose	10.0
Potassium phosphate	3.5
Sodium phosphate	2.0
Agar	10.0

pH = 7.5 ± 0.2

Suspend 36g in 1 liter of distilled water. Add 4 ml (or as directed by the supplier) of a 10% w/v alcoholic solution of Basic Fuchsin (95% Ethyl Alcohol).

Bring to the boil to dissolve completely. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Mix well before pouring.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- يجري التحضين في أطباق بتري على درجة حرارة من ٣٥ – ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.
- وجود مستعمرات تستطيع تخمـــر اللاكتوز مثـــل التابعـة للـــColiform bacteria تظهر وردية اللون أو ذات لون أحمر عميق.
- أما المستعمرات التي لا تستطيع تخمر اللاكتوز فتظهر عديمة اللون شفافة.

9. Hektoen Enteric Agar:

FORMULA	gm/liter
Proteose peptone	12.0
Yeast extract	3.0
Lactose	12.0
Sucrose	12.0
Salicin	2.0
Bile salt No.3	9.0
Sodium chloride	5.0
Sodium thiosulphate	5.0
Ammonium ferric citrate	1.5
Acid fuchin	0.1
Bromothymol blue	0.065
Agar	14.0

pH = 7.5 ± 0.2

DO NOT Autoclave.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- عادة تصب هذه البيئة في أطباق بتري.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة.
- هذه البيئة عادة تستخدم للتفرقة بين الـ*Salmonella spp.*، *Shigella*.

- *Shigella spp.*: تظهر كمستعمرات خضراء رطبة مرتفعة.
- *Salmonella spp.*: مستعمرات خضراء مزرقة مع وجود أو عدم وجود مركز أسود.
- *Pseudomonas spp.*: مستعمرات خضراء أو بنية اللون مسطحة.

10. Kligler Iron Agar:

FORMULA	gm/liter
"Lab lemco" powder	3.0
Yeast extract	3.0
Peptone	20.0
Sodium chloride	5.0
Lactose	10.0
Dextrose	1.0
Ferric citrate	0.3
Sodium thiosulphate	0.3
Phenol red	0.05
Agar	12.0

pH = 7.4 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121°C/ 15 min.

خواص المستعمرات المختبرة:

- عادة تصب هذه البيئة في أنابيب في صورة أجار عميق butt أو أجار مائل slope.
- يجري تحضين البيئة بعد التلقيح على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٤٨ ساعة.
- عند حدوث تخمر للجلوكوز ((و ليس اللاكتوز)) يؤدي هذا إلى تكوين لون أصفر على الأجار المائل – لوجود الظروف الهوائية- يتحول سريعا إلى اللون الأحمر – نتيجة تكون وسط قلوي.
- أما بالنسبة للأجار العميق فيتكون اللون الأصفر نتيجة تخمر الجلوكوز تحت الظروف اللاهوائية – نتيجة تكون الحامض.

و الجدول التالي للتفرقة بين بعض أجناس الـ *Salmonella spp.*، *Shigella*.

Organisms	Butt	Slope	H_2S
Sh. dysenteriae	A	NC	-
Sh. sonnei	A	NC	-
S. typhi	A	NC or ALK	+
S. paratyphi A	AG	NC or ALK	-
S. paratyphi B	AG	NC or ALK	+
S. typhimurium	AG	NC or ALK	+
S. enteritidis	AG	NC or ALK	+

AG = acid (yellow) and gas formation.

A = acid (yellow)

NC = no change.

ALK = alkaline (red)

+ = hydrogen sulphate (black).

- = no hydrogen suphate (no black)

11. Kohn- Two – Tube Medium:

Medium No. 1:

FORMULA	gm/liter
"Lab lemco" powder	2.0
Yeast extract	2.0
Peptone	15.0
Dextrose	1.0
Mannitol	10.0
Phenol red	0.05
Agar	16.0

pH = 7.4 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 115°C/ 15 min.

- After sterilization cool to 60 °C and add 25 ml of sterile 40% W/V urea solution.
- Mix well, and pour slope slants with a generous butt.
- Incubate slant and butt.

تستخدم هاتين البيئتين للدلالة على:

- قدرة البكتريا على تخمر كل من الجلوكوز، السكروز، المانيتول، الـSalicin.
- قدرة البكتريا على إنتاج H_2S.

- قدرة البكتريا على إنتاج الإندول.
- قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم اليوريز.
- قدرة البكتريا على الحركة.

Medium NO. 2

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Tryptone	10.0
Sucrose	10.0
Salicin	10.0
Sodium chloride	5.0
Sodium thiosulphate	0.016
Disodium phosphate	0.09
Bromothymol blue	0.02
Agar	3.0

pH = 7.4 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 115°C/ 15 min.

• تحضير ورق إختبار الإندول Indole:

- يجري تحضير ورق ترشيح في صورة شرائح ٥ مم × ٥٠ مم.

- و تغمر في المحاليل التالية:

p-dimethylaminobenzaldhyde	5 g
o-phosphoric acid	10 ml
Methanol	50 ml

تجفف على درجة حرارة ٥٠ مْ لأقل فترة.

تحضير ورق إختبار H_2S:

- يتم تحضير ورق ترشيح بنفس الطريقة السابقة.
- يغمر الورق في محلول من خلات الرصاص lead acetate.
- يجفف في فرن هواء ساخن على حرارة ٧٠ مْ.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

البيئة رقم (١):

- يتم عادة تلقيح البيئة من مستعمرة واحدة نامية على أحد بيئات العزل الصلبة.
- يجب إستخدام الإبرة المستقيمة في عملية التقليح و ليس أبرة التقليح الحلقية.
- يتم غرس التقليح بعمق في أنابيب الأجار العميق (butt) أو عمل غشاء على سطح الأجار المائل (slope).
- عادة بعد مرور ١٨ – ٢٤ ساعة من التحضير على درجة حرارة ٣٧مْ يتم إنتاج حامض نتيجة تخمر الجلوكوز تحت الظروف الهوائية (sople) أو الظروف

اللاهوائية (butt) و يمكن الكشف عن ذلك عن طريق تغيير لون الدليل المستخدم (phenol red).

- يتغير لون الدليل تدريجيا من اللون الأصفر (pH 6.8) إلى اللون الأحمر الزاهي (alkalaine) (pH 8.4) و هذا عند تحلل اليوريا بفعل إنزيم يوريز urease.
- الكائنات الحية الدقيقة التي تخمر الجلوكوز تظهر باللون الأصفر في الأجار العميق دون تكون غاز. أما على الأجار المائل فيظل اللون كما هو دون تغير (أحمر).
- عند تكون اللون أصفر على الأجار المائل يعطي دلالة على تخمر سكر المانتول.

البيئة رقم (٢):

- عادة يجري التلقيح للبيئة التي تعبأ في أنابيب حتى إرتفاع الثلث بواسطة مستعمرة واحدة نقية بإستخدام إبرة تلقيح مستقيمة.
- يجري تعليق ورق الإختبار المحضر للكشف عن كل من الإندول Indol و كبرتيد الهيدروجين H_2S فوق سطح البيئة دون أن يلامسها و يثبت على حافة الأنبوبة بواسطة السدادة القطنية.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة.
- تفحص النتائج بعد التحضين و هي تعطي دلالة على:

أ) تغير لون دليل bromothymol blue من الأخضر عند pH 7.4 إلى الأصفر pH 6.0 الدلالة على حدوث تخمر للسكروز أو salicin.

ب) حدوث إنتشار للنمو مع تكون عكارة turbidity بالبيئة دلالة على حركة البكتريا motility.

ج) تلون ورق إختبار H_2S باللون الأسود دلالة على تكون هذا الغاز.

د) تحول لون ورق الكشف عن الإندول من القرمزي pink إلى الأحمر red ليعطي نتيجة موجبة لإنتاجه.

جدول التفرقة بين أجناس *Salmonella, Shigella spp.* بإستخدام كل من Medium 1 & 2.

Organisms	Medium No. 1			Medium No. 2			
	Fermentation of		Urease production	Ferm. of sucrose or salicin	motility	Production of H_2S	Indole
	Dextrose	Mannitol					
S. typhi	A	A	-	-	+	+	-
Other Salmonella	AG	A	-	-	+	±	-
Sh. Sonnei	A	A	-	-	-	-	-
Sh. flexneria	A	A	-	-	-	-	±

AG = Acid and gas

A = Acid Only

\- = No reaction

± = Variable reaction

12. Lysine Decarboxylase Broth:

FORMULA	gm/liter
Yeast extract	3.0
Dextrose	1.0
L-lysine	5.0
Bromocresol purple	0.016

pH = 6.1 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121°C/ 15 min.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- تعبأ هذه البيئة في أنابيب إختبار بواقع ٣ مل بيئة لكل أنبوبة.
- تنقل لمسة بإستخدام إبرة التلقيح من المستعمرة المختبرة إلى البيئة.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة.
- أثناء المراحل الأولى من التحضين يحدث تخمر لسكر الجلوكوز مكون بذلك حامض يغير من لون دليل bromocersol purple إلى اللون الأصفر yellow.
- بعد إنتهاء فترة التحضين تستطيع البكتريا إستخدام الحامض الأميني ليسين L-lysine بنزع مجموعة الكربوكسيل منه ليتكون وسط قلويalkaline فيتغير لون البيئة إلى القرمزي purple.

و يمكن التفرقة بين بعض أفراد السالمونيلا و الشيجيلا بفعل إزالة مجموعة الكربوكسيل من الليسين كالتالي:

Organisms	Lysine decarboxylation
S. typhi	+
S. parayphi A	-
Other type salmonella	+
Sh. pathogenic species	-

Purple color : positive reaction

Yellow color : negative reaction

13. Lysine Iron Agar:

FORMULA	gm/liter
Peptone	5.0
Yeast extract	3.0
Dextrose	1.0
L-lysine	10.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Sodium thiosuphate	0.04
Bromocresol purple	0.02
Agar	14.5

pH = 6.7 ± 0.2

Sterilize by Autoclaving at 121°C/ 15 min.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- يجري عمل أجار مائل slants أو عميق butts في أنابيب إختبار.
- تلقح هذه الأنابيب بإستخدام إبرة تلقيح مدببة على butts أو تخطط على الأجار المائل slants و هذا من المستعمرات المختبرة.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لفترة ٢٤ ساعة (طوال الليل).
- المستعمرات ذات القدرة على تخمر سكر الجلوكوز (Dextorse) تغير لون البيئة إلى اللون الأصفر لتكون حامض acid لوجـود دليل bromo cresol purple.
- المستعمرات التي لها قدرة على إزالة مجموعة الكربوكسيل من الليسين تؤدي إلى جعل الوسط قلوي alkaline و يتكون بذلك اللون القرمزي purple.
- المستعمرات التي تملك القدرة على تكوين H_2S hydrogen sulphide تسبب تكون لون أسود بكثافة.
- بعض سلالات *Proteus spp.* تعمل على إزالة مجموعة الأمين deamination من الليسين منتجة لون أحمر red على slant نتيجة تكون قلوي إلا أنه يتكون حامض في الـــbutt.

Organisms	slant	Butt	H_2S
Salmonella spp.	Alkaline	Alkaline	+
Proteus spp.	Red	Acid	-
Shigella spp.	Alkaline	Acid	-

14. Muller-Kanffman Teterathionate Broth (BASE)

FORMULA	gm/liter
Tryptone	7.0
Soya peptone	2.3
Sodium chloride	2.3
Calcium carbonate	25.0
Sodium thiosulphate	40.7
Ox Bile	4.75

- يجري تحضير البيئة بوزن مكوناتها و نقلها إلى ماء مقطر و الغليان في حمام مائي حتى الذوبان.
- تبرد البيئة حتى ٤٥مْ و يضاف إليها:

١٩ مل محلول أيودين Iodine solution.

٩,٥ مل (٠,١%) محلول أخضر البريلينت brilliant green.

- تنقل بعد ذلك في دوارق أو أنابيب معقمة و هي تستخدم لتنشيط كل من السالمونيلا و الشيجيلا.

:Iodine Solution

يحضر بإذابة ٢٥ جرام من أيوديد البوتاسيوم Pot. iodide في ٥ مل ماء مقطر يضاف إليهم ٢٠ جرام أيودين Iodine يجري الرج حتى الذوبان الكامل يكمل الحجم النهائي إلى ١٠٠ مل.

:Brilliant green solution

يضاف ٠,١ جرام من هذه الصبغة إلى ١٠٠ مل ماء مقطر مع إجراء الرج، يسخن المحلول على درجة حرارة ١٠٠ م° لمدة ٣٠ دقيقة مع إجراء الرج من وقت إلى آخر حتى ذوبان الصبغة تماما، يجري تخزينها في زجاجات بنية اللون بعيدا عن الضوء.

15. Simmons Citrate Agar (SCA):

FORMULA	gm/liter
Magnesium sulphate	0.2
Amm. Dihydrogen phosphate	0.2
Sod. Amm. Phosphate	0.8
Sodium citrate, tribasic	2.0
Sodium chloride	5.0
Bromothymol blue	0.08
Agar	15.0

pH = 7.0 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121°C/ 15 min.

الوصف و خواص المستعمرات المختبرة:

- هذه البيئة يمكن إستخدامها في صورة أجار مائل slants أو تصب في أطباق بتري و بعد صبها تلقح بواسطة المستعمرات المختبرة على السطح.
- فترة التحضين هي ٢٤ ساعة على درجة حرارة ٣٧م°.

- المستعمرات ذات القدرة على إستخدام السترات كمصدر وحيد للكربون تؤدي إلى إنتاج قلوي alkaline (تعطي إختبار موجب) حيث يتحول لون دليل bromothymol blue من الأخضر green إلى الأزرق اللامع bright blue.
- بينما في الإختبار السالب يظل لون البيئة كما هو أخضر دون تغير.
- هذا الإختبار يستخدم للتفرقة بين *S. enteritidis* و عدد من السالمونيلا الواقعة تحت I, II, III, IV و هي تعطي نتيجة موجبة لهذا الإختبار إلا أن كل من *Sh. flexneria, Sh. dysentria, S. paratyphi A, S. typhi* تعطي نتيجة سالبة لهاذ الإختبار (green).

16. XLD Medium

FORMULA	gm/liter
Yeast extract	3.0
L-lysine-HCl	5.0
Xylose	3.75
Lactose	7.5
Sucrose	7.5
Sodium desoxycholate	1.0
Sodium chloride	5.0
Sodium thiosulphate	6.8
Ferric amm. Citrate	0.8
Phenol red	0.08
Agar	12.5

pH = 7.4 ± 0.2

Do Not over heat

الوصف و خواص المستعمرات:

- تذاب مكونات البيئة في ماء مقطر مع الرج حتى الغليان مع مراعاة عدم زيادة فترة الغليان.
- تنقل هذه البيئة بعد ذلك في حمام مائي على درجة حرارة ٥٠م، و تصب في نفس الوقت و بسرعة في أطباق بتري.
- يجري التخطيط على سطح البيئة المتصلب و الموجود في أطباق بتري من المستعمرات المختبرة.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧م لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

- المستعمرات التابعة للـ*Salmonella spp* تكون ذات لون أحمر مع وجود مركز أسود red colonies with black centers.
- المستعمرات التابعة للـ*Shigella spp* و أيضا *S.paratyphi A* تكون ذات لون أحمر فقط.
- إذا كانت المستعمرات ذات لون أصفر ذات قمة فهي تكون تابعة لبعض الأجناس الأخرى الواقعة في العائلة Enterbactericeae.

الإختبارات البيوكيميائية للتعرف على كل من السالمونيلا والشيجيلا

Biochemical Assay for Identification of *Salmonella spp.* and *Shigella spp.*

الإختبارات البيوكيميائية للتعرف على كل من السالمونيلا و الشيجيلا

Biochemical Assay for Identification of *Salmonella spp.* and *Shigella spp.*

١. إختبار إنتاج الإندول Indole production test:

التطبيق و البيئة المستخدمة:

- يجب أولا نقل لمسة من المستعمرة البكتيرية المختبرة من إحدى بيئات العزل إلى ٥ مل من بيئة ماء التربتون tryptone water و يجري التحضين لمدة ٢٤ ساعة على درجة حرارة ٣٥مْ، أو لمدة ٤٨ على درجة حرارة ٣٧مْ.

Tryptone water

FORMULA	gm/liter
Tryptone	10.0
Sodium chloride	5.0

pH = 7.5 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

الأساس العلمي:

تعتبر مادة التربتون من إحدى المواد السريعة لإنتاج الإندول نظرا لمحتواها العالي من الحامض الأميني تربتوفان tryptophan حيث تستطيع بعض البكتريا تكوين الأندول من هذا الحامض الأميني.

إختبارات الكشف:

يمكن إستخدام أحد الإختبارين التاليين للكشف عن وجود الإندول.

(أ) – إختبار دليل كوفاك (Kovacs) Kovac's test reagent:

Para-Dimethylaminobenzaldhyde	5 gm
Amyl alcohol	75 ml
Hydrochloride acid con.	25 ml

- يتم إضافة ٠,٢ مل من دليل كوفاك إلى أنابيب ماء التربتون الملقح بالمستعمرة المختبرة مع الرج و تركها لمدة ١٠ دقائق.
- تكون لون أحمر قاتم dark red في الطبقة السطحية لكحول الإيمايل تعطي نتيجة موجبة لإختبار الأندول، عند عدم حدوث تغير للون الطبيعي للدليل (أصفر) تكون النتيجة سالبة.

(ب)– دليل إيهليش Ehrlich's reagent:

Solution I:

Para-Dimethylaminobenzaldhyde	4 gm
Absolute alcohol	380 ml
Hydrochloride acid con.	80 ml

Solution II:

Saturated potassium persulphate

- يتم إضافة ١ مل من محلول رقم (I) إلى ماء التربتون الملقح بالمستعمرة المختبرة و يخلط جيد، ثم يترك لبعض دقائق يلي ذلك إضافة ٠,٥ مل من محلول رقم (II).
- تكون لون أحمر خلال ٥ دقائق من الإضافة الأخيرة يعطي نتيجة موجبة للبكتريا المنتجة للإندول.

٢. إختبار أحمر الميثايل Methyl Red test:

التطبيق و البيئة المستخدمة:

- يتم نقل عدد إثنين لمسة بواسطة إبرة التلقيح two loop full من أحد المتسعمرات المختبرة يكون عمرها ٤ – ٦ ساعات و النامية في بيئة Peptone water إلى ٥ مل من بيئة MRVP و يجري التحضين على درجة حرارة ٣٠مْ لمدة ٣ أيام.

Peptone water

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0

pH = 7.2 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

MRVP medium

FORMULA	gm/liter
Peptone	7.0
Dextrose	5.0
Dipotassium hydrogen phosphate	5.0

pH = 7.5 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

الأساس العلمي:

- في إختبار أحمر الميثايل (MR) يعطي نتائج موجبة إذا كانت البكتريا تملك القدرة على تخمر سكر الجلوكوز Dextrose و إنتاج حامض يغير من قيمة الـpH إلى ٤,٥ أو أقل و هذا يؤدي إلى تغير لون الدليل من الأصفر إلى الأحمر red.

إختبار الكشف:

- يتم إضافة ٥ نقط من دليل أحمر الميثايل methyle red indicator إلى ٥ مل من بيئة MRVP المحضنة و السابق تحضيرها و تلقيحها.
- تكون لون أحمر في الأنابيب بعد مرور ١٠ دقائق يعطي نتيجة موجبة MR^+.

دليل أحمر الميثايل MR indicator:

- تحضر بإذابة ٠,١ جرام أحمر الميثايل في ٣٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥% ويكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر.

٣. إختبار Voges-Proskaur VP test:

الأساس العلمي:

- يتم إستخدام نفس الأسلوب السابق إتباعه في إختبار أحمر الميثايل من نقل المستعمرات من بيئة peptone water و التنمية على بيئة MRVP تحت نفس الظروف.
- تعطي البكتريا نتائج موجبة في هذا الإختبار إذا كانت تملك القدرة على تكوين مركب acetyl methyle carboinol من الجلوكوز بعد إنتهاء فترة التحضين في بيئة MRPV.
- و عند إضافة قلوي يتحول المركب السابق إلى مركب diacetyl نظرا لأكسدته و الذي إذا أتحد مع الحامض الأميني أرجنين arginine أو السرتين creatin أو السرتنين ceartinine فيؤدي هذا إلى تكون لون وردي rose.

إختبارات الكشف:

و للكشف عن تكوين مركب diacetyl تجرى إتباع الخطوات التالية:

أ) دليل أوميرا O'Meara's reagent:

- يحضر بإذابة ٤٠ جرام هيدروكسيد بوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء مقطر.
- بعد تمام الذوبان و بعد أن يبرد، يضاف إلى هذا المحلول ٠,٣ جرام سرتين أحادى الماء (creatine monohydrate).

- يمكن إستخدام هذا الدليل مباشرة أو حفظ في ثلاجة على درجة حرارة +٤مْ لمدة شهر واحد.
- يضاف ٥ مل من هذا الدليل إلى ٥ مل من بيئة MRVP الملقحة و المحضنة مع الرج.
- عند تكون لون قرمزي pink بعد مرور ٣٠ دقيقة تكون النتيجة موجبة VP^+.

ب) دليل باريت Barritt's reagent:

محلول (I):

يحضر بإذابة ٥ جرام الفانافثول ∝-naphanol في ١٠٠ مل كحول إيثايل.

محلول (II):

يحضر بإذابة ١٦ جرام هيدروكسيد بوتاسيوم potassium hydroxide في ١٠٠ مل ماء مقطر.

- يضاف ٠,٥ مل من محلول ∝-naphanol إلى ٥ مل من بيئة MRVP الملقحة و المحضنة يلي ذلك إضافة ٠,٥ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم مع الرج.
- عند تكون لون أحمر red بعد مرور ٥ دقائق تكون النتائج موجبة VP^+.

ج) محلول كبريتات النحاس Copper sulfate solution:

- يحضر بإذابة ١ جرام من كبريتات النحاس (copper sulfate 5 hydrate) في ٤٠ مل محلول أمونيا ٢٥% (ammonia solution 25%) و يخلط مع ٦٩٠ مل محلول ١٠% هيدروكسيد بوتاسيوم.
- يضاف ٥ مل من هذا المحلول إلى ٥ مل من بيئة MRVP الملقحة مع الرج.
- عند تكون لون أحمر red بعد مرور عدة دقائق تكون النتائج موجبة VP^+.

٤. إختبار Simmon's citrate test :

التطبيق و البيئة المستخدمة:

- يتم نقل لمسة من بيئة ماء الببتون peptone water الملقح بالمستعمرة المختبرة بإستخدام إبرة التلقيح (تحضين ٢٤ ساعة على درجة حرارة ٣٥م) إلى بيئة simmon's citrate agar التي يمكن صبها في أطباق بتري أو صبها في أنابيب بواقع ٤ – ٥ مل لكل أنبوبة في صورة أجار مائل slope أو عميق butt.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧م لمدة ٤٨ ساعة.

Simmon's Citrate Agar

FORMULA	gm/liter
Magnesium sulphate	0.2
Ammonium dihydrogen phosphate	0.2
Sodium ammonium phosphate	0.8
Sodium citrate, tribasic	2.0
Sodium chloride	5.0
Bromothymol blue	0.08
Agar	15.0

pH = 7.5 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

الأساس العلمي:

حينما تنمو بعض الأفراد البكتيريه على هذه البيئة و تملك القدرة على إستخدام السترات citrate كمصدر وحيد للكربون – يلاحظ أن هذه البيئة لا تحتوي على أي مصادر آخرى للكربون سوى السترات – فإنها تقوم بتكسير السترات إلى مركبين هما Oxaloacetic acid و Acetate و يتحول هذا المركب الأخير ميتابولزميا إلى حامض بيروفيك pyruvic acid و الذي يتوجه تبعا لنظام ميتابولزم الخلية البكتيريه في وجود الصوديوم لتكوين شق قلوي عبارة عن خلات صوديوم sodium acetate و sodium formate أوتكون شق حامضي نظرا لتكون ثاني أكسيد الكربون الذي يكون كربونات و بيكربونات الصوديوم Sodium carbonate و Sod. bicarbonate.

- في وجود دليل bromothymol blue (لون أخضر عند pH 7.0) يتحول لون هذ الدليل في الإختبار إلى الموجب و هو إنتاج القلوي إلى اللون الأزرق blue، بينمكا يتكون اللون الأصفر yellow عند إنتاج الحامض و في حالة بقاء لون البيئة كما هو أزرق تكون نتيجة الإختبار سالبة.

إختبار الكشف:

- الأفراد التابعة للـ *Shigella spp.* لا تستطيع النمو على هذه البيئة و بالتالي فالنتيجة سالبة حيث لا تستطيع إستخدام السترات كمصدر وحيد للكربون.
- بعض الأفراد التابعة *Citrobacter, Enterobacter, Serratia spp.* تستطيع إستخدام السترات كمصدر وحيد للكربون و لكنها تعطي نتائجه سالبة و لذا يظل لون البيئة أزرق.
- كل من *Salmonella subgenus I, II, IV& S. enteritids* تكون موجبة لإختبار السترات.
- كل من *S. typhi & S. paratyphi A* تكون سالبة لإختبار السترات.

٥. إختبار إنتاج كبرتيد الهيدروجين Production of H_2S test:

التطبيق و البيئات المستخدمة:

- عادة يتم نقل لمسة من المستعمرات النامية على أحد بيئات العزل أو التفرقة مثل بيئة SS agar أو Bisumuth sulphate agar و هذا لمعرفة قدرتها على إنتاج كبرتيد الهيدروجين.

- يجري تلقيح بيئة peptone water بهذه اللمسة و يجري التحضين لمدة ١٨ إلى ٢٤ ساعة على درجة حرارة ٣٧مْ.

- يتم إستخدام إبرة التلقيح المستقيمة straight wire بغمرها في بيئة ماء الببتون الملقحة بالمستعمرة المختبرة بعد إنتهاء فترة التحضين و هذا في مركز الأجار العميق حتى المنتصف و المحضر من إحدى البيئات التالية مع التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٢ – ٢٤ ساعة.

1. Kligler Iron Agar (see pag. 65).
2. Kohn-Two Tube Medium (see pag. 68).
3. SIM Culture Medium (see pag. 40).
4. Triple Sugar Iron Agar (see pag. 36).
5. Lysine Iron Agar (see pag. 74).
6. Friewer Shaughnessy Medium (FSM).

و تتركب البيئة الأخيرة من:

FSM Base No. 1

FORMULA	gm/liter
Beef extract	3.0
Peptone	30.0
Agar	3.0
Bromothymol blue	0.01

FSM Base No. 2

FORMULA	gm/liter
Lactose	10.0
Lead acetate	0.05

(يجب ألا تزيد درجة حرارة الذوبان عن ٤٥م)

- هذا الإختبار يكشف عن مقدرة البكتريا على تحلل بعض الأحماض الأمينية المحتوية على شق الكبريت مثل methionine, cystine, and cysteine بإنتاج إنزيمات محللة لهذه الأحماض لتتفرد مجموعة السلفاهيدرين H_2S.
- يلاحظ أن جميع البيئات الغذائية المستخدمة في هذا الإختبار تحتوي على مركب الببتون peptone الغني بالأحماض الأمينية الكبريتية و هو مصدر شق H_2S.
- و عند توافر شق معدني في وجود H_2S يؤدي هذا إلى تكون كبريتيد المعدن ذو اللون الأسود فتظهر المستعمرات باللون الأسود.
- تحتوي جميع البيئات السابقة على شق الحديد – عدا البيئة رقم ٦ تحتوي على شق رصاص – فمثلا يتواجد مركب sodium thiosulphate بالإضافة إلى مركب peptonized iron في البيئة ٣ و مركب ferrus sulfate في البيئة ٤ و بالتالي فعند إنفراد H_2S بواسطة البكتريا و إتحاده مع الشق الحديد الموجود في البيئات من ١ إلى ٥، يتكون كبرتيد الحديد ذو اللون الأسود أو إتحاد H_2S مع شق الرصاص (البيئة رقم ٦) يتكون كبرتيد الرصاص ذو اللون البني أو الأسود brown or black.

إختبار الكشف:

- تكون مستعمرات سوداء اللون black أو مستعمرات ملونة ذات مركز أسود في الأطباق أو يكون خط التلقيح في الأجار العميق ذو اللون أسود يعطي إختبار موجب لإنتاج H_2S.
- تكون أي مستعمرات أخرى غير سوداء أو ملونة لا تملك مركز أسود أو عدم تلون خط التلقيح في الأجار العميق باللون الأسود يعطي إختبار سالب لإنتاج H_2S.

٦. إختبار الحركة Motility test:

التطبيق و البيئات المستخدمة:

- يمكن الكشف عن قدرة البكتريا على الحركة بإختبار المستعمرات النقية النامية على إحدى بيئات العزل و التفرقة السابقة بإستخدام أكثر من إختبار و التي منها:
  - إختبار النقطة المعلقة Hanging Drop.
  - إختبار الكشف عن الحركة بإستخدام الأجار العميق.

في الإختبار الثاني يتم إستخدام إبرة التلقيح المدببة بنقل لمسة من ماء الببتون peptone water الملقح بالمستعمرة المختبرة و المحضن على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة و هذا على أحد البيئات التالية:

1. Friewer Shaughnessy Medium (see page 92).
2. SIM Culture Medium (see page 40).
3. Motility Test Medium (MTM).

- بلاحظ أن البيئة رقم (١) يمكن إستخدامها للكشف عن حركة البكتريا و أيضا القدرة على إنتاج H_2S للسالمونيلا و الشيجيلا.
- البيئة رقم (٢) تستخدم لكشف عن حركة البكتريا و أيضا قدرتها على إنتاج كل من Indole, H_2S.
- البيئة رقم (٣) هي البيئة للكشف عن حركة البكتريا فقط.

MT Medium

FORMULA	gm/liter
Tryptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Agar	5.0

pH = 7.2 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

الأساس العلمي:

- بعض أفراد البكتريا تملك أسواط سواء كانت طرفية أو جانبية أو منتشرة على طول الخلية البكترية و بالتالي تستطيع السباحة و التحرك داخل البيئة الغذائية و التي عادة تحتوي على كمية قليلة من الأجار لتسمح للبكتريا بالحركة و الإنتشار و ذلك حول خط التلقيح في الأجار العميق مسببة إنتشار واضح حول هذه المنطقة أو عكارة واضحة في البيئة المستخدمة الشبه سائلة. و بالتالي تعطي إختبار موجب.

- بينما إذا ظلت المنطقة على طول خط التلقيح دون إنتشار للنمو أو ظلت البيئة الشبة سائلة رائقة فذلك يعطي إختبار سالب للحركة.

الإختبار و الكشف:

- البكتريا التي تمك القدرة على الحركة تعطي مع كل من البيئتين (١،٢) إنتشار كامل ذو لون أسود حول منطقة التلقيح و هذا مع بعض السلالات التابعة للـ*Salmonella subgenus I, II, III, IV*، بينما يظهر الإنتشار بوضوح في البيئة (٣).

- بعض السلالات التابعة للـ *S. paratyphi*، *S. typhi* تكون ذات نشاط حركي قليل و لذا فهي تنمو على طول خط التلقيح فقط مكونة عكارة سوداء فقط دون أن تنتشر بشدة.

- السلالات التابعة للـ *Shigella spp.* لا تملك القدرة على الحركة و غير مكونة للـH_2S و بالتالي فهي تنمو فقط على خط التلقيح دون أن تنتشر أو تكون لون أسود.

٧. القدرة على النمو في وجود سينانيد البوتاسيوم KCN growth:

التطبيق و البيئة المستخدمة:

- عادة يستخدم بيئة peptone water الملقحة تلقيح ثقيل بواسطة عدة لمسات من المستعمرة المختبرة و المنقولة من إحدى بيئات العزل و يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة.

- ينقل حوالي ٠,٥ مل أو نقطة من هذه البيئة إلى ٤ مل من بيئة KCN Broth مع التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ و متابعة الأنابيب الملقحة من يوم إلى أربعة أيام.

KCN Broth (Base)

FORMULA	gm/liter
Proteose peptone	3.0
Pot. Dihydrogen phosphate	0.225
Disodium hydrogen phosphate	5.640
Sodium chloride	5.0

pH = 7.6 ± 0.1

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

- بعد التعقيم يضاف لكل ١٠٠ مل من هذه البيئة ١,٥ مل محضر بارد من محلول ٠,٠٥ % سيانيد البوتاسيوم potassium cyanide (سام).
- يجري توزيع هذ الخليط في أنابيب معقمة بواقع ٤ مل لكل أنبوبة و تغطي بواسطة غطاء مطاط.
- إذا لم تستخدم هذه الأنابيب في نفس يوم التحضير يضاف إليها طبقة من زيت البرافين المعقم Paraffin oil بسمك ٥ مليمتر و هذا لمنع تبخر حامض الهيدروسيانيد hydrocyanic acid و يمكن حفظها للإستخدام لمدة ٢-٣ يوم على درجة حرارة الثلاجة.

الأساس العلمي:

- عادة البكتريا الهوائية aerobic bacteria تمتاز بوجـود إنزيـم cytochrome oxidase اللازم لإتمام التنفس في وجود الأوكسجين أما البكتريا اللاهوائية anerobic bacteria تفتقر لوجود هذا الإنزيم و لذا إذا توفر الأوكسجين لها فهي لا تستطيع النمو أو التكاثر و بالتالي تهلك.

و إنزيم الـcytochrome oxidase يحدث له تثبيط في وجود شق السيانيد (CN) نظرا لحدوث تنافس غير عكسي بين (CN) و ذرة الحديد الموجودة بالإنزيم و بالتالي يتوقف عمل هذا الإنزيم.

- و نظرا لأن هناك بعض الأفراد البكتيرية الهوائية و التي تملك نظام فلافوبروتين التنفسي flavo-protein respiration system فإنها تستطيع النمو و التكاثر بالرغم من وجود شق السيانيد و هي التي تعطي نتيجة موجبة مع هذا الإختبار.

إختبار الكشف:

- البكتريا التي تملك القدرة على النمو في وجود سيانيد البوتاسيوم تؤدي إلى جعل البيئة رائقة clear و تعطي إختبار سالب و هذا مع الأفراد التابعة للـ*Salmonella, Shigella spp.* ماعدا *S. subgenus IV*.

- البكتريا التي تملك القدرة على النمو في وجود سيانيد البوتاسيوم تؤدي إلى تعكير البيئة و لو بكمية بسيطة و تعطي إختبار موجب و هذا البعض الأجناس التابعة لعائلة Enterobacteriaceae.

٨. إنتاج حامض وغاز من الجلوكوز Produce acid and gas from glucose

التطبيق و البيئات المستخدمة:

- يجري هذا الإختبار للكشف عن البكتريا التي تملك القدرة على إنتاج حامض أو غاز بتخمرها للجلوكوز و يتم ذلك بنقل لمسة من المستعمرات النامية من أحد بيئات العزل أو التفرقة على أحد البيئات التالية.

1. Basel Medium

FORMULA	gm/liter
Tryptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Bromo cresol purple 1%	2.5 ml
Glucose	10.0

- هذه البيئة تستخدم عامة في الكشف عن تكون حامض أو غاز من نتيجة تخمر سكر الجلوكوز لأي نوع من أنواع البكتريا.
- عادة يمكن إستخدام دلائل indicators آخرى بدلا من الدليل المستخدم مثل:

  ٠,٠١ % دليل أحمر الفينول Phenol red.

  ١% دليل Andrade's indicator.

- عادة يجري إذابة مكونات البيئة بواسطة البخار (دون إضافة الدليل المختار) و يضبط pH حتى ٧,٢ ثم يضاف بعد ذلك الدليل.

Andrade's indicator

Acid fuchsin	0.5 g
Sodium hydroxide (1.0 N)	16 ml
Distilled water	100 ml

- عادة يذاب الفوكسين الحامضي في الماء و يضاف إليها NaOH و يترك المحلول لمدة ٢٤ ساعة على درجة حرارة الغرفة قبل الإستخدام.
- توزع البيئة بواقع ٣ ، ٥ مل في أنابيب إختبار ذات غطاء حلزوني مع وضع أنابيب درهام Durham tubes بقاع أنبوبة الإختبار.
- يجري تعقيم البيئة بإستخدام الأوتوكلاف (١٢١م/ ٢٠ دقيقة).

2. Peptone water

FORMULA	gm/liter
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Indicator	
Glucose	10.0

pH = 7.2 ± 0.2

- الدلائل المستخدمة هي نفس الدلائل السابقة بالتركيزات التالية:

1.0 % Andrade's indicator

0.01 % Phenol red

0.0025% Bromo cresol purple

- و يتبع نفس الأسلوب السابقة في توزيع و تعقيم البيئة.
- يجري التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٧ أيام بعد تلقيح البيئة بالمستعمرة المختبرة.

الأساس العلمي:

بعض الأفراد البكتيرية تملك القدرة على إنتاج حامض و غاز عن طريق تخمر الجلوكوز و هذا تحت الظروف اللاهوائية و هذا يؤدي إعطاء نتائج موجبة لهذا الإختبار إذ أن لون الدليل المستخدم يتغير تبعا لتكون الحامض – هناك بعض أفراد تعطي نتائج عكسية بتكوين قلوي و قد تكون غاز حيث يظهر ذلك في أنابيب درهام.

إختبار الكشف:

- الأفراد التابعة لكل من *Shigella* and *Salmonella spp.* تستطيع تخمر الجلوكوز و بالتالي تعطي نتائج موجبة مع الدلائل الثلاثة المستخدمة.
- الأفراد التابعة للـ*Salmonella sp.* تعطي نتائج موجبة لتكون غاز في حين الأفراد التابعة للـ *Shigella* تعطي نتائج سالبة.
- و تكون النتائج الموجبة لتكون حامض مع الدلائل المستخدم كالتالي:
  - Andrades indicator يعطي لون قرمزي Pink.
  - Phenol red يعطي لون من الأحمر إلى الأصفر red to yellow.
  - Bromo cresol purple يعطي لون أصفر.

و تفسر النتائج كالتالي:

Salmonella & Shigella spp.	Acid	Gas
Sh. flexneria	+	-
Sh. dysenteria	+	-
S. typhi	+	-
S. paratyphi A	+	+
S. paratyphi B	+	+
S. typhimurium	+	+
S. enteritides	+	+
S. subgenus I, II, III, IV	+	+

- أيضا يمكن إستخدام بيئة Kligler Iron agar (see page 65) و هي تكشف عن البكتريا المنتجة للحامض من سكر الجلوكوز دون اللاكتوز و أيضا الكشف عن تكون غاز و شق كبرتيد الهيدروجين H_2S.

٩. تخمر السكريات المختلفة:

التطبيق و البيئات المستخدمة:

من السكريات الأخرى التي يمكن إستخدامها للتفرقة بين الأفراد التابعة لكل من السالمونيلا و الشيجلا هي:

- اللاكتوز Lactose.

- المانيتول D-Mannitol.
- السوربيتول D- Sorbitol.
- الارابينوز L- Arabinose.
- الرافينوز Reffinose.
- المالتوز Maltose.
- أيضا يستخدم بعض السكريات للتفرقة بين الأفراد التابعة للـ *Shigella sp.* و التي منها Xylose, Sucrose, Reffinose, Mannitol.

و من البيئات المستخدمة في هذا المجال.

1. Peptone water (see page 100).
2. Basel medium (see page 99).

و بنفس الأسلوب المستخدم في إختبار الكشف عن تكون حامض و غاز (page 99,100) و لكن مع الأخذ في الإعتبار الإحتياطات التالية:

- يستخدم أحد الدلائل الثلاثة السابقة و بنفس النسب.
- يستخدم السكريات المشار إليها حيث تحضر بنسبة ١٠% في الماء المقطر و يجري تعقيمها عن طريق مرشحات التعقيم حيث لا تضاف إلى بقية مكونات البيئة خوفا من تحطيمها بواسطة حرارة التعقيم مع مراعاة أن تضاف بمقدار ٠,٣ مل أو ٠,٥ مل منها إلى مقدار قدره ٣ أو ٥ مل من البيئة المستخدمة (تمثل هذه القيمة نسبة ١% سكر).
- يطبق نفس أسلوب الإختبار السابق.

الأساس العلمي:

- لا يختلف الأساس العلمي في قدرة بعض أفراد البكتريا على إحداث تخمر لبعض السكريات دون غيرها لتكون في النهاية حامض و غاز أو حامض فقط و بالتالي يمكن الكشف عنهما في وجود دليل مناسب و أنابيب درهام.

نتائج الإختبار:

أنظر الجدول الموضح لذلك صفحة ٤٣ و أيضا النتائج الموضحة صفحة ١٠٢.

١٠. إختبار إختزال النترات Reduction of Nitrate:

التطبيق و البيئات المستخدمة:

- يمكن الكشف عن البكتريا التي تملك القدرة على إختـــزال النتـــرات Nitrate (NO_3^-) إلى نيتريت Nitrite (NO_2^-) بإختبار المستعمرات النقية النامية على إحدى بيئات العزل و التفرقة.
- حيث يتم نقل لمسة من إحدى هذه المستعمرات على البيئات المستخدمة لذلك و الموجودة بأنابيب بوقع ٥ مل لكل أنبوبة و التي تحتوي على أنابيب درهام Durham tubes و يتم التحضين تبعا لنوع البيئات المستخدمة و الموضحة لكل منهما.

1. Potassium Nitrate Medium.

FORMULA	Gm/liter
Beef extract	3.0
Peptone	5.0
Pot. Nitrate	5.0

pH = 7.0 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

2. Nitrate Broth.

FORMULA	Gm/liter
Sodium chloride	4.6
Peptone	8.6
Pot. Nitrate	1.5

pH = 7.0 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

3. Nitrate Peptone Water.

FORMULA	Gm/liter
Sodium chloride	5.0
Peptone	10.0
Pot. Nitrate	0.2

pH = 7.0 ± 0.2

Sterilize by autoclaving at 121 °C/15 min

فترات التحضين:

- بيئة (١) التحضين على درجة حرارة ٣٥مْ لمدة ٤٨ ساعة.
- بيئة (٢) التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٢ – ٢٤ ساعة.
- بيئة (٣) التحضين على درجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢ – ٧ أيام.

<u>الأساس العلمي:</u>

- بعض الأفراد البكتيرية تحت الظروف اللاهوائية تملك القدرة على إختزال النترات NO_3^- إلى نيتريت NO_2^- حيث تقوم البكتريا بإستقبال الأوكسجين من النترات لتحوله إلى نيتريت.
- و بالتالي يمكن الكشف عن وجود النيتريت NO_2^- بإستخدام دليل Griess-Ilosvoy's reagent و الذي عند إضافته إلى أحد البيئات الثلاثة الملقحة بالمستعمرة المختبرة بعد إنتهاء فترة التحضين يتكون مركب معقد من β-sulfono-azo naphthyamine ذو اللون الأحمر إلى قرمزي Red-pink ليعطي إختبار موجب.
- عدم تكون اللون الأحمر يدل على سالبية هذه البكتريا لقدرتها على إختزال النترات إلى نيتريت و بالتالي يمكن الكشف عن وجود النترات بإستخدام معدن الزنك zinc metal.
- أيضا يمكن الكشف عن تكون غاز (نتروجين) في أنابيب درهام حيث أن هذه البيئات لا تحتوي على أي نوع من السكر أو أي مواد قابلة للتخمر ليعطي إختبار موجب لإختزال النترات.

إختبارات الكشف:

للكشف عن تكون النيتريت Nitrite (NO_2^-) يستخدم الدليل التالي: Griess- Ilosvay's reagent و الذي يتكون من جوهر (I) ، (II).

جوهر (I):

يحضر بإذابة ١ جرام من sulphanilic acid في ١٠٠ مل من حامض خليك acetic acid (5N).

جوهر (II):

يحضر بإذابة ١ جرام α-Naphthnol في ١٠٠ مل كحول إيثايل ٩٥%.

* يمكن إستخدام بدلا من جوهر (II) محلول آخر III يتكون من إذابة ٥ جرام α-naphthyl amine مذاب في ١٠٠ مل حامض خليك acetic acid (5N).

- يتم إضافة ١ مل من الجوهر رقم (I) و ١ مل من الجوهر رقم (II) أو المحلول الآخر (III) إلى أحد البيئات الثلاثة السابقة الملحقة و الموجودة بالأنابيب بعد إنتهاء فترة التحضين.

- تكون لون أحمر إلى قرمزي red-pink ليعطي إختبار موجب لوجود النتريت.

- إذا لم يتكون اللون الأحمر يضاف جرعة قليلة من معدن الزنك (ملليجرامات) و عند تكون راسب يعطي نتيجة سالبة لوجود النترات NO_2^- و (نتيجة موجبة لوجود النترات NO_3^-).

المراجع

المـــــراجـــــع

1. Banwart, G.J. (1989). Basic Food Microbiology (2nd ed.) AVI Book, Van Nostrand Reinhold, New York.

2. The oxide Manual fifth Edition (1982) Oxide Limited, wade Road, Basingstoke Hampshire, RG24 OPW.

3. Handbook of Microbiology, Dehydrated Culture media, culture media bases, sundry preparations of microbiology, E.Merck, Darmastadt, Federal Republic of Germany.

4. Difco Manual (1984). Manual of Dehydrated Culture, Media and Reagent for Microbiology. Difco laboratories, Detroit, Michigan, USA.

5. Handbook of Microbiology 1st supplement E. Merck, Darmastradt, Federal Republic of Germany.

6. Preparations for Microbiology, Dehydrated Culture Media, culture media bases, sundry preparations, E. Merck, Darmstadt Federal Republic of Germany.

7. Frazier, W.C (1976). Food Microbiology (3rd ed.) TATA MC Craw – Hill Pub Co., New delhi.

8. Harrigan, W.F. & Mccance, M.E (1990). Laboratory Methods in Food and Diary Microbiology 8th printing Academic Press Inc, London.

9. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore; Williams and Williams Co. London.

10. Krieg, N.R., and Holt, J.G (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1. Baltimore Md.; Williams and Williams Co. London.

11. Boone, D.R., Castenholz, R.W., and Garrity, G.M. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol 1 Springer – Verlag, New York.

12. Banwart, G.J. (1989). Basic Food Microbiology 2nd ed., AVI Book Published by Van Nostrand Reinhold New York.

13. Diliello, L.R. (1982). Methods in Food and Diary Microbiology, AVI publishing, INC Westport, Connecticut.

14. Saunders, C. (1983). Food Legislation Surverys No. 9, Microbiology standards for foodstuffs, laboratories at the British Food Manufacturing Industries Research Association, Randalls Road Leatherhead, surres, England.

15. Kingsbury,. D.T. and wagner, G.E. (1990) Microbiology, The National Medical Series for Independent study 2nd ed. Williams and winkins, USA.

INDEX

INDEX

Acid Fuchsin	100.
Acetic	90.
Acetic acid	107.
Acetyl methyl carbinol	87.
Acid from	103.
Glucose	45, 95, 102.
Lactose	18, 46, 102.
Mannitol	46.
Raffinose	46.
Sucrose	46.
Xylose	46.
Ammonium iron citrate	38.
Ammonium sol.	89.
Amyl alcohol	42, 84.
Andrade's indicator	99, 100, 101.

Barritt's reagent	88.
Basel medium	99, 103.
Basic fuchsin	51, 63.
Bile salts	26, 30.
Biochemical assay	44.
Bismuth sulfate agar	27, 28, 33, 37, 91.
Brain heat infusion	35, 55.
Brilliant green	28, 30, 32, 76.
Brilliant green agar	32, 35, 56.
Brilliant-green phenol red lactose agar	27, 31, 33, 34, 37.
Bromo crysol blue	91.
Bromo crysol purple	73, 75, 100, 101.
Bromo thymol blue	71, 78, 91.
Buffered peptone water	27, 57.

Carbol fuchsin 49, 51.

Citrate 15, 19.

Citrobacter 14, 43, 91.

Coliform groups 26, 28, 30, 32, 63.

Colon bacilli 27.

Cooked meat medium 35, 57.

Copper sulfate sol. 89.

Creatine monohydrate. 87.

Crystal violet soli. 49, 50.

Cytochrome oxidase 98.

DCLS agar 35, 59.

Desoxycholate citrate agar 35, 60.

Diacetyl 87.

p-Dimethyl aminobenaldhyde 42, 70, 84.

Domain Bacteria 13.

Durham tubes 100, 104.

EE broth 27, 35, 62.

Ehrlich-Boehime test 41, 42, 84.

Ehrlich reagent 84.

Endo agar (Base) 35,62.

Endotoxin 16.

Entrobacter 14, 43, 91.

aerogenes 34, 39.

Enterobactericeae 13, 14, 23, 38, 43, 79, 98.

Enterobacteriales 13.

Erwinia 14.

Esherichia 14.

coli 34, 39, 43, 60.

Facultative anaerobic 13, 14, 31.

Fecal coli and enterococci 26.

Fermentation of	
Amygdain	15.
Arabinose	45, 103.
Glucose	15, 68, 70, 72, 75, 99, 102.
Inositol	15.
Lactose	15, 45, 102.
Maltose	15, 45, 103.
Mannitol	15, 45, 68, 70, 72, 103.
Raffinose	45.
Salicin	68, 71, 103.
Sorbitol	15, 45, 72, 103.
Sucrose	15, 45, 68, 71, 72, 103.
Xylose	103.
Ferric citrate	30.
Ferruas sulfate	93.
Flavoprotein respiration	98.
Friewer shaughnessy medium	92, 93, 94.

Gamaproteobacteria 13.

Gas from 15, 45, 98, 102, 103.

Glucose 15, 45, 99.

Acid and gas production 45, 99.

Gram negative 13, 14, 18, 49.

Gram positive 49.

Gram staining method 47, 49.

Gram iodine solution 50.

Griess-ilosvoy's reagent 106, 107.

Hanging drop 94.

Hektoen enteric agar 35, 44, 64.

Hydrogen cyanide 97.

Hydrogen sulfide 15, 19, 40, 43, 45, 67, 68, 93, 94, 96.

Paper 71, 72.

Production 68, 71, 75, 91, 95, 102.

Indole test 43, 45, 95.

negative 15.

paper 69, 72.

production 46, 68, 71, 83, 95.

Iodine solution 25, 76.

Inositol 15.

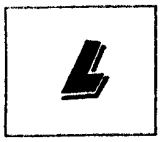
Iron sulfate 29.

Klebsiella 14, 43.

Kliger iron agar 44, 65, 92, 102.

Kohn-two tube medium 44, 68, 88.

Kovac's reagent 41, 42, 84.



Lactose broth	24.
Lactose fermentation	15, 45, 102.
Lead acetate solution	70.
Lipase production	15.
Lysine decarboxylase broth	44, 73.
Lysine decarboxylation	74.
Lysine iron agar	74, 92.

Maltose fermentation	15, 45, 103.
Mannitol fermentation	15, 45, 68, 70, 72, 103.
Methanol	70.
Methyl red	45, 85, 86.
Motility	14, 18, 40, 43, 45, 68, 72, 94.
Motility test medium	94, 95.
MRVP	85, 86, 87, 88, 89.
Muller-Kauffmann tetrathionate broth	27, 76.

α-Naphthol 88, 107.

Neutral red 30.

Nitrate broth 24, 35, 99.

Nitrate peptone water 99.

Nitrate redaction 15, 45.

Nitrite 15.

Nutrient broth 24, 35.

O' Meara's reagent 87.

Oxalic acid paper test 41.

Paraffin oil 94.

Pathogenic 16.

Peptone water 85, 87, 89, 92, 94, 96, 100, 103.

Peptonized iron 93.

Phenol red 37, 71, 89, 100.

Phosphoric acid	70.
Potassium cyanide growth	19, 45, 96, 98.
broth	97.
Potassium hyderoxide	88.
Potassium nitrate medium	105.
Potassium persulfate sol	42, 84.
Proteolytic organisms	58.
Proteus	14, 27, 28, 33, 34, 56, 61, 75.
Proteus vulgaris	34, 39.
Pseudomonas	56, 65.
Pyruvic acid	90.
Raffinose fermentation	45.
Rods	13.
Saccharolytic strains	58.
Safranin solution	51.

Salmonella	13, 14, 15, 17, 33, 39, 43, 45, 56, 64, 75, 95, 101, 102.
arizona	15, 45.
enteridis	16, 17, 34, 39, 67, 78, 91, 102.
javiana	16, 17.
subgenus I, II, III, IV	45, 78, 91, 96, 102.
paratyphi	26, 96.
paratyphi A	15, 16, 39, 45, 67, 74, 78, 79, 91, 102.
paratyphi B	16, 34, 39, 61, 67, 91, 102.
paratyphi C	16.
pullorum	34, 39.
typhi	15, 16, 26, 28, 33, 34, 39, 43, 45, 61, 67, 74, 78, 96, 102.
typhimarium	16, 17, 39, 67, 102.
Salmonella & Shigella agar	29, 30, 33, 34, 37.
Selenit broth	26.
Selenit cystine broth	24, 26.
Seratia	14, 91.

Shigella	13, 14, 18, 33, 39, 43, 45, 46, 64, 75, 79, 91, 96, 98, 101, 102, 103.
boydii	19, 46.
dysenteria	19, 39, 45, 46, 67, 102.
flexneria	19, 33, 39, 45, 46, 61, 76, 102.
pathogenic species	74.
sonnei	19, 46, 61, 67.
SIM culture medium	36, 40, 43, 92, 94.
Simmons citrate agar	44, 45, 75, 85, 86.
Sodium heptadecyl sulfate	25.
Sodium selenite	26.
Sodium thiosalfate	30.
Sorbitol (D)	15, 45, 68, 71, 72, 103.
Sucrose	15.
Sucrose fermentation	15, 45, 68, 71, 72, 103.
(β) Sulfono-aazo naphthylamine	106.
Sulphanilic acid	107.

Tergilol No.7 25.

Tetrathional broth 24, 25.

Triple sugar iron agar 15, 36, 39, 88.

Turbidity 39, 72.

Tryptone water 41, 42, 43, 44, 78.

Typhoid bacilli 27.

Urea 68, 70, 72.

Solution 68.

Urease 68, 70, 72.

Veges proskaur 45, 87, 88.

XLD medium 35, 78.

Yersina 14.

Ziehl-Neelsen's carbol fuchsin 51.

Zinc metal 106, 107.