استعمال الأصباغ الحيوية والأشعة فوق البنفسجية في تشخيص جراثيم الـ *Salmonella typhimurium*

طه ياسين غني
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة تشخيص جراثيم *Salmonella typhimurium* عن طريق استخدام الاصباغ الحيويه والأشعة فوق البنفسجية وقد درست جميع المواصفات الكيموحيوية والصفات المظهرية الخاصة بهذه الجراثيم. استخدمت 14 صبغة مختلفة حيث وجد بان صبغة الهيماتوكسلين تثبط نمو جراثيم السالمونيلا كما انها اعطت ومضان فسفوري احمر على اكار السوربتول مع الحديد.

The use of The Vital Stains and Ultra-Violent light in the Diagnosis of *Salmonella typhimurium*

T. Y. Ghani
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad.

Abstract

The aim of this study was used the vital stains and U.V. light as means of diagnosis of *Salmonella typhimurium*. All morphological and biochemical characterization of this organism were studied also. Fourteen different stains were used and the result indicated that hematoxylin inhibited the growth of Salmonella and also gave U.V. red fluorescence on Sorbitol-Iron agar.

المقدمة

تحتل الدراسات الخاصة بالبكتريا المعوية جزء هاما في علم الاحياء المجهرية حيث تكتسب هذه المجموعة أهميتها نظرا لاتساع انتشارها في الطبيعة وتكون التربة والمياه والأغذية البيئة المناسبة لها بالإضافة إلى اعتبار معظمها من الأحياء المجهرية الطبيعية لأمعاء الإنسان والحيوان (1). وتعتبر الأنماط المختلفة لجرثومة السلمونيلا من اهم انواع اجناس العائلة المعوية والمسببة للالتهاب المعدي– الأمعائي والمؤدية إلى خسائر اقتصادية كبيرة إضافة إلى حالات التسمم الغذائي (2). وتكون البكتريا المعوية ممرضة كامنة أو ممرضة انتهازية حيث تسبب او تشارك في احداث عدة امراض في الانسان والحيوان ولها دور مهم في الصحة العامة.ان جر ثومة السالمونيلا تضم انواع كثيرة لها القدرة على إحداث المرض في الانسان والحيوان وتسببها في داء السالمونيلية Salmonellosis و الحمى التايفوئيدية Typhoid fever (3).

استهدفت هذه الدراسة تشخيص مستعمرات السالمونيلا عن طريق اضافة الاصباغ الحيوية (Vital dyes) إلى الوسط الزرعي وملاحظة التغيرات الحاصلة على المستعمرات وعلى الوسط الزرعي وكذلك تشخيص هذه الجراثيم عن طريق تعريضها الى الأشعة فو ق البنفسجية وملاحظة الومضان المنعكس منها.

المواد وطرائق العمل

- **العترة المستخدمة**تم الحصول على العتر ة *Salmonella typhimurium* من خزين فرع الاحياء المجهرية في كلية الطب البيطري ذي الرقم (13314) ATCC حيث حفظت بطريقة التجفيد لحين استخدامها في المختبر وقد ثبتت نقاوة هذه العترة بواسطة صبغة كرام المطورة والزرع على الاوساط الزرعية الخاصة بها إضافة إلى الفحوص الكيمياوية حسب ما جاء في (4).
- **الأصباغ المستخدمة في الدراسة:** لقد حضرت الأصباغ التالية ليكون تركيزها النهائي في الاوساط الزرعية بالنسب التالية (0.02% , 0.04%) وكما موضحة في جدول (1).

جدول (1)

.1	صبغة الكونغو الحمراء	Congo red stain
.2	صبغة تريبان الزرقاء	Trypan blue stain
.3	صبغة البسمارك البنية	Bismark Brown stain
.4	صبغة الكلروسدين الصفراء	Chryosidin Yellow stain
.5	صبغة ايوسين الصفراء	Eosin Yellow stain
.6	صبغة تراي فنيل تترازوليوم كلورايد	2,3,6,Triphenyl Tetrazolium chloride
.7	صبغة الهيماتوكسلين	Hematoxylin stain
.8	صبغة الزارين	Alizarin stain
.9	صبغة الاورسين	Orecin stain
.10	صبغة نكروسين	Nigrosin stain
.11	صبغة ايفانس الزرقاء	Evans blue stain
.12	صبغة المثيل الحمراء	Methyl red stain
.13	صبغة اليشين الزرقاء	Alcian blue stain
.14	صبغة المتعادلة الحمراء	Neutral red stain

- **الاصطباغ الحيوي لمستعمرات جرثومة السالمونيلا:** تمت دراسة هذه الظاهرة وذلك بتنمية السالمونيلا على وسط القاعده المغذي Nutrient Base Medium المحضر مختبريا حسب (5) وذلك بزرعها على سطح الوسط الزرعي في الطبق بواسطة طريقة التخطيط وذلك بعد اضافةالصبغ الحيويه الى الوسط الزرعي لتكون بتركيزين نهائيين هما (0.04%,0.02%) وضبط الأس الهيدروجيني ليكون 7. زرعت أطباق غير حاويه على الصبغ (كضابط للتجربة control) للمقارنة بين النتائج. ثم حضنت الأطباق المزروعة في حاضنة بدرجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعةوقرأت النتائج بمتابعة الحجم والحدود الخارجية والعلامات اللونية للمستعمرات وقابلية المستعمرة على تجميع او تركيز الاصباغ فيها وكذلك ملاحظة طبيعة انتشار الصبغة في داخل المستعمرة وقابلية الأصباغ الحيوية على تثبيط النمو والتغيير الذي يحصل في الوسط الزرعي المستخدم. وقد تم اعادة هذه التجربة لجميع الأصباغ الحيوية المذكورة ثلاث مرات للتاكد من سلوك هذه الجراثيم عند تغيير الصبغ. كما تم فحص ومتابعة المستعمرات الجرثومية عيانيا ومجهريا وتصويرها باستعمال المجهر المصور(photomicroscope). ولدراسة الومضان الفسفوري للأشعة فوق البنفسجية على مستعمرات السالمونيلا فقد استخدم مصدر للأشعة فوق البنفسجية وهو عبارة عن جهاز كهربائي ذو شدة ضوئية قدرها 4 واط ومصباح ذو طول موجي 366 نانوميتر ويستعمل في صندوق مظلم لغرض فحص النمو ومتابعة التغيرات

اللونية المنبعثة من المستعمرات ووضعت الة تصوير مزودة بمرشح لتقليل انتشار الأشعة فوق البنفسجية وتصوير الومضان الفسفوري المنبعث من المستعمرات واستخدام جهاز مقياس الضوء الطيفي بطول موجي يتراوح بين 700–400 نانوميتر لغرض تحليل الومضان الفسفوري.

أستخدم اكار (oxoid) S.S.agar السالمونيلا– شكيلا وحضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المنتجة وتعقيمه حسب الطرق المتبعة. ثم زرعت جرثومة السالمونبلا على الوسط المغذي وحضنت لمدة 24 ساعة في 37 درجة مئوية ثم زرعت على طبق السالمونيلا– شيكلا بطريقة التخطيط وترك احد الاطباق بدون زرع ووضعت الاطباق جميعها في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية ولمدة 24–48 ساعة على التعاقب حيث قرأت النتائج لكلا المدتين لموجة طولية للأشعة فوق البنفسجية قدرها 336 نانوميتر في صندوق مظلم وكررت هذه التجربة وسجلت نتائج الومضان الفسفوري حيث تم قراءة الكثافة النوعية وعلاقتها بمقدار الومضان الفسفوري المنبعث.

النتائج

أظهرت النتائج بان نمو جرثومة *Salmonella typhimurium* كان كثيفا على جميع الاوساط الزرعية المضافة إليها الأصباغ ما عدا صبغة الهيماتوكسلين فانها ثبطت نمو هذه الجرثومة وان وجود الصبغ كان متمركزا في المستعمرة لأغلـ بـ الصبغات المستخدمة وان مستعمرات هذه البكتريا قد اصطبغت بالصبغ التالية: الكروسين الصفراء، الصبغة المتعادلة الحمراء، النكروسين، صبغة اليشين الزرقاء وصبغة ايفانس الزرقاء ولم يحصل تغيير للون الوسط الزرعي المستخدم ما عدا في حالة اضافة صبغة الكروسين الصفراء حيث حصل تغيير في تركيز 0.04% من اللون الاصفر الى الاصفر الفاتح وعند استخدام صبغة التترازوليوم كلورايد فان اللون تحول الى اللون الاسود ومع صبغة الاورسين فان اللون تغير من الارجواني الفاتح الى الاحمر البني. أما صبغة المثيل الحمراء فان اللون تغير الى اللون الأحمر جدول (2).

جدول (2) تأثير الصبغات على نمو وصفات جرثومة *Salmonella typhimurium* وعلى صفات الوسط المستخدم

الصبغة	النمو بتركيز		وجود الصبغة	تلون	تغيير لون الوسط
	0.02%	0.04%	في المستعمرة	المستعمر ة	الزرعي
الكونغو الحمراء	+++	+++	متمركز ة	موجب	لم يتغير
تريبان الزرقاء	+++	+++	متمركز ة	موجب	لم يتغير
بسمارك البنية	+++	+++	متمركز ة	موجب	لم يتغير
كروسدين الصفراء	+++	+++	–	سالب	إلى الأصفر الفاتح بتركيز 0.04%
ايوسين الصفراء	+++	+++	منتشر ة	موجب	لم يتغير
تراي فينيل تترازوليوم	+++	+++	منتشر ة	موجب	إلى اللو ن الأسود
هيماتوكسلين	-ve	-ve	–	–	–
الزارين	+++	+++	–	سالب	لم يتغير
اورسين	+++	+++	متمركز ة	موجب	من الارجواني الفاتحا إلى الأحمر – البني
الصبغة المتعادلة الحمراء	+++	+++	–	سالب	لم يتغير
نكروسين	+++	+++	–	سالب	لم يتغير
ايفانس الزرقاء	+++	+++	---	سالب	لم يتغير
المثيل الحمراء	+++	+++	محيطية متمركز ة	موجب	إلى اللو ن الأحمر
اليشين الزرقاء	+++	+++	---	سالب	لم يتغير

+++ نمو بكتيري كثيف

– لم تنمو

أظهرت نتائج ظاهرة الومضان الفسفوري الاحمر عند تعريض جراثيم السالمونيلا الى الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 366 نانوميتر ومضانا فسفوريا احمر عند زرعها على وسط السوربتول مع الحديد جدول (3).

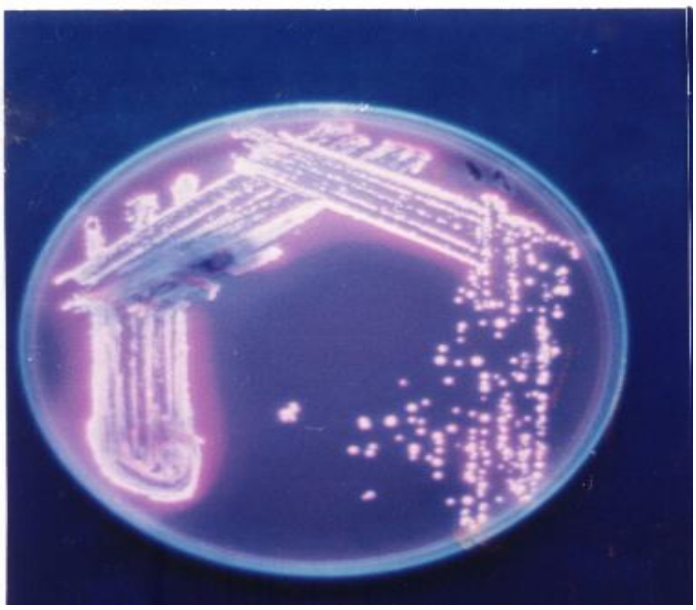
جدول (3) الومضان الفسفوري الأحمر لمستعمرات جراثيم السالمونيلا تايفيموريم عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية وبعد مرور (24) و(48) ساعة على الحضن

ت	أوساط الزر عية	جرثومة السالمونيلا تايفموريوم
.1	اكار الصفراء الأحمر البنفسجي Violet Bile Agar (Difco)	-ve
.2	الوسط المغذي لعائلة البكتريا المعوية	-ve

	Enterbacteriaceae Enrichment medium (BBL)	
.3	الاكار المغذي الصلب Nutrient agar (Oxoid)	-ve
.4	اكار السوربتول مع الحديد Sorbitol Iron agar (BBL)	++
.5	اكار الماكونكي MacConkey agar (Oxoid)	-ve
.6	اكار ايوسين مثلين الأزرق EMB (BBL)	-ve
.7	اكار ليفان ايوسين مثلين الأزرق Levine, Eosin Methylene Blue agar	-ve
.8	اكار السالمونيلا شكيلا S.S. agar (Oxoid)	-ve
.9	اكار الاندو ENDO agar (Oxoid)	-ve
.10	اكار مائل دلي DLLI slant agar (BBL)	-ve
.11	اكار سلفات البزموث Bismith Sulphate agar (Difco)	-ve
.12	اكار الماكونكي بدون كرستل الزرقاء MacConkey agar without crystal violet (Difco)	-ve
.13	اكار الدم Blood agar	-ve

المناقشة

تم متابعة جراثيم السالمونيلا المستخدمة من حيث الفحص المجهري المباشر والصفات الشكلية وشكل المستعمرة ونموها وفعالياتها الكيموحيوية ووجد بأنها متطابقة مع ما ذكره (4، 6، 7، 8) وعند استعراض النتائج فيلاحظ انتشار الصبغة في الوسط والمستعمرات على حد سواء وهذا دليل على اصطباغهما معا ويستدل من ذلك ان هذه الصبغ سريعة الذوبان في الماء ووزنها الجزيئي قليل. أما بالنسبة لحالة التثبيط التي حدثت لجراثيم السالمونيلا مع صبغة الهيماتوكسلين وذلك بسبب تجمع المواد الايضية المثبطة والسامة في المستعمرات وفي الاوساط الزرعية وليس بسبب فشل التغذية أو الهبوط في الاس الهيدروجيني كما ذكر ذلك (9) إذ ان بعض الاصباغ تعتبر سامة انتقائية لقسم من البكتريا حيث تمنع نمو الجراثيم. ان نمو السالمونيلا على الوسط الحاوي على صبغة المثيل الحمراء وبتركيز 0.02 % قد اختزل لون الصبغة من الحمراء إلى عديمة اللون مثله في ذلك مثل المثلين الأزرق مما يشجع على استخدام صبغة المثيل الحمراء كدليل لقياس جهد الأكسدة والاختزال نتيجة النمو أو التلون إضافة إلى كونه دليلا لتغيير الأس الهيدروجيني. وفي هذه الدراسة نجد بان كثافة الومضان الفسفوري له علاقة بكثافة الزرع الجرثومي المستخدم حيث كلما ازدادت الكثافة الزرعية للجراثيم ازدادت كثافة الومضان الفسفوري الأحمر وان الكثافة الكلية للومضان الفسفوري له علاقة بالكثافة الضوئية الممتصة وتعتمد حدودها على الظروف البيئية للنمو وبمعرفة مكونات الوسط الزرعي السالمونيلا شكيلا حيث يلاحظ بان مكونات هذا الوسط الزرعي يحتوي على الأملاح الصفراء والصبغة المتعادلة الحمراء الأمر الذي يوضح بان الومضان الفسفوري الأحمر نتيجة لتأثير هاتين المادتين إضافة إلى ما تضيفه البكتريا نفسها أو ما تطرحه من مواد ايضية وقد أعطت جرثومة السالمونيلا ومضان فسفوري احمر فقط على اكار السوربتول مع الحديد صورة (1). ا ن هذه الملاحظات ان دلت على شيء فإنها تدل على خصوصية جراثيم السالمونيلا وسلوكها في ايض الأصباغ الموجودة في الأوساط الزرعية ثم تفاعلها مع الأشعة فوق البنفسجية الساقطة عليها وهذا يعتمد على العوامل البيئية الخاصة بالايض.



صورة (1) توضح جرثومة السالمونيلا مع ومضان فسفوري احمر على اكار السوربتول مع الحديد

المصادر

1. Cruickshank, K. B.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. & Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology, 12th ed. E.L.B.S. and Churchill Livingstone.
2. Wright, J. G.; Tengelsen, L. A.; Smith, K. E.; Frank, R. K. & Grendon, J. H. (2005). Multidrug-resistance *Salmonella typhimurium* in four animal facilities. Emerg. Infect. Dis., 11(8):1235-1241.
3. Calvert, N.; Stewart, W. C. & Reilly, W. J. (1998). *Salmonella typhimurium*_DT 104 infection in people and animals in Scotland: a Collaborative epidemiological study 1993-96. Vet. Record., 143 (13): 351-354.
4. Carter, G. R. & Wise, D. J. (2004). Essential of veterinary Bacteriology and Mycology 6th Ed. Iowa state University press (United States).
5. Hede'n, C. & Illeni, T. (1975). New approaches to the identification of microorganisms. A Wiley Biomedical Health Publication.
6. Balous, A. & Hausler, W. J. (1981). Diagnostic procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infection. 10th Ed. American public health Association publication.
7. Edwards, P. R. & Ewing, W. H. (1972). Identification of Enterobacteriaceae. 3rd Ed. Burgess publishing co. Minneapolis.
8. Carter, G. R. (1984). Diagnostic procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology. 4th Ed. Spring field Illinois charles C. Thomas.
9. Hochberg, M. S. & Falkman, J. (1972). Mechanism of size limitation of Bacterial Colonies. J. of Infe. Dis., 126 (6):642-635.