المحاضرة الخامسة - درس الأحياء المجهرية المتقدم -الجزء العملي-

الاوساط الزرعية Culture Media

تدعى المادة أو المواد الغذائية المستخدمة لنمو وتكاثر الاحياء المجهرية مختبريا بالاوساط الزرعية Culture media ويجب ان يحتوي الوسط على جميع الاحتياجات الغذائية الضرورية للنمو وتوفر الطاقة والوحدات الاساسية لبناء اجزاء الخلية وتراكيبها . واهم هذه الوحدات هي الكاربون C (الطاقة) النيتروجين N والماء (70-90%) الغني بالعناصر المعدنية مثل النحاس والخارصين والكوبلت كما يحتوي الوسط على املاح "Na,K,Ca,Mg" وفيتامينات ومساعدات النمو والدواريء buffers التي تمنع أي تغير واضح في درجة حموضة الوسط PH وذلك عن طريق تفاعلها مع الحوامض او القواعد ليبقى PH الوسط بحدود التعادل .من امثلة الدواريء بعض الاملاح خاصة الفوسفاتية منها:

$KH_2PO_4 + NaOH \rightleftharpoons KNaHPO_4 + H_2O$

$KNaHPO_4 + NaOH \rightleftharpoons KNa_2PO_4 + H_2O$ القاعدة مع

$K_2HPO_4 + HCl \rightleftharpoons KH_2PO_4 + KCl$ الحامض مع

ويمكن للكاربونات والمواد العضوية كالبروتينات(البيتون) ان تعمل كدواريء حيث ان الفعاليات الحيوية لبعض الاحياء المجهرية قد تؤدي إلى زيادة كمية الحوامض أو القواعد . وظيفة الداريء هي لمنع هذا التغير السريع في الوسط الغذائي .
تقسم الاوساط حسب حالتها الفيزيائية إلى:

1-البيئات السائلة Liquid Media : وتشمل

الوسط المغذي nutrient broth, glucose broth, tryptic soy broth, brain heart infusion هذا النوع من البيئات يستخدم للإغراض التالية :

1-لتنمية الاحياء بكميات كبيرة.
2-لدراسة التخمر Fermentation
3- للاختبارات البايوكيميائية
4-تستخدم بيئة thioglycolate broth لتنمية البكتريا اللاهوائية أو قليلة الاحتياج للهواء anaerobic and microaerophilic لاحتوائه على مادة الصوديوم ثايوكلايكوليت sodium thioglycolate الذي يتفاعل مع جزيئة الاوكسجين وإزالته وبهذا يؤثر على خفض جهد الاكسدة والاختزال في الوسط.

2- البيئات الصلبة Solid media

تحضر هذه البيئات بإضافة مواد مصلبة للوسط مثل الاكار agar والجيلاتين إلى البيئة الغذائية السائلة.
Agar: مادة متعددة السكريات polysaccharide تستخلص من نوع من الطحالب البحرية .Geledium spp من اهم خصائصه :

1-لا يتحلل بيولوجيا، أي ان معظم الاحياء المجهرية غير قادرة على تكسير واستهلاكه كمادة غذائية.
2-لا يتحطم بالدرجات الحرارية العالية كذلك من الممكن تعقيمه بالحرارة العالية للموصد 121 م.
3-يذوب بدرجة حرارة° 28 م ويتجمد بدرجة حرارة 45 م ولا يتميع بدرجة حرارة الغرفة.
4- -يضاف بنسبة 1.5-2%

اما الجيلاتين :عبارة عن مادة بروتينية تتكون من 15 حامض اميني مرتبطة مع بعضها بأواصر ببيتدية من خصائصه:

1-يتحلل بيولوجياً من قبل بعض البكترية المنتجة لإنزيم Gelatinase
2-يتميع بدرجة حرارة 26 م ويتجمد عند الدرجات الحرارية الواطئة.
3-يضاف إلى الوسط بنسبة 10-15%

مثال على الاوساط الصلبة الاكار المغذي Nutrient Agar اكار الدم Blood Agar ، اكار الدم المطبوخ Chocolate Agar اما فوائدها :

1-لدراسة صفات المستعمرات للبكتريا والاعفان.
2-لعزل الكائن بصورة نقية من المزارع المختلطة.
3-لخزن المزارع.

4-دراسة بعض التفاعلات الكيموحيوية.
تصب البيئات الصلبة في اطباق Petri Dish في انابيب اما على هيئة :
أ -اكار عميق Deep Agar لتنمية الاحياء المجهرية اللاهوائية
ب -الاكار المائل Slant Agar لحفظ المزارع ودراسة بعض الصفات البايوكيميائية .

3- البيئات شبه الصلبة Semi Solid Media

يستخدم هذا النوع من البيئات لدراسة حركة البكتريا وتنمية البكتريا اللاهوائية مثال SIM وتقسم الاوساط الزراعية حسب طبيعة مكوناتها إلى :
1-الاوساط الصناعية Synthetic Media وهي الاوساط التي فيهلا مكونات معلومة الكمية.
2-الاوساط الطبيعية Non-Synthetic Media وهي اوساط مكوناتها طبيعية مثل الحليب والبيض والبطاطا ومصل الدم مثال ذلك وسط المرق المغذي Nutrient Broth ، المتكون من خلاصة اللحم Beet Extract والببتون Peptone خلاصة الخميرة Yeast Extract هي الاخرى من اكثر المكونات شيوعا واستخداما. هذا النوع من البيئات يكون معقد التركيب وغني بالفيتامينات والمغذيات.

الببتون Peptone

هو عبارة عن بروتين حيواني لحوم أو كازائين أو نباتي فول الصويا أو بذور القطن معامل بإنزيمات هاضمة مثل التربسين ينتج عن عملية الهضم الانزيمي خليط من البتيدات، الحوامض الامينية، كربوهيدرات، اضافة إلى مواد عضوية ولا عضوية .اضافة الببتون إلى الوسط الزرعي يوفر كل المتطلبات المعدنية الضرورية للكائن الحي مثل الفسفور، الكبريت، الكربون العضوي والنتروجين.

طريقة تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media

يتم بإذابة وزن معلوم من الوسط في الماء المقطر اعتماداً على التعليمات الموجودة على علب الاوساط الزرعية الجاهزة وقد تستخدم الحرارة فقط في تحضيره الاوساط الزرعية الحاوية على الاكار لإذابة جميع مكونات الوسط ويمكن استخدام جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer لتسهيل هذ الخطوة .

ضبط الا الهيدروجيني PH adjustment

بعد تحضير الوسط يؤخذ حجم قليل من البيئة ويضبط الاس الهيدروجيني لها بالتالي نضبط PH الحجم الكلي للوسط قبل تعقيمه مثلا نأخذ 5 مللتر من الوسط الغذائي ونضعها في بيكر ونضيف قطرة من الدليل" وهو عبارة عن مواد كيميائية تتغير الوانها بتغير PH الوسط " . إذا كانت البيئة قاعدية تسحح باستخدام 0.1 عياري HCl وإذا البيئة حامضية تسحح باستخدام 0.1 عياري NaOH ثم نحسب كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة 5 مل من البيئة ثم نستخرج كمية الحامض أو القاعدة اللازمة لمعادلة 1000 سم^3 من البيئة .

انواع البيئات الغذائية

1-البيئات الغنية Enriched media
بعض انواع البكتريا تحتاج إلى مواد اضافية في الوسط اضافة إلى المكونات الرئيسية مثل الدم المصل، السائل الخلبي بنسبة 10% أو الكلوكوز بنسبة 2% وتضاف هذ المواد إلى البيئات الاعتيادية بعد تعقيمها بجهاز التعقيم. لأنها مواد بروتينية أو سكريات تتلف في درجات التعقيم العالية من امثلة هذه الاوساط:
أ -بيئة اكار الدم blood agar تستخدم لتنمية انواع من البكتريا التي تحتاج إلى بروتينات وفيتامينات موجودة في الدم يحضر من اضافة الدم إلى وسط الاكار المغذي بعد تعقيمه وتبريد إلى درجة حرارة 50° م.
ب -وسط اكار الدم المطبوخ chocolate agar يضاف الدم إلى وسط الاكار المغذي 90-95 م يستخدم لتنمية بعض البكتريا المعقدة مثل *Haemophilus influenza* .
ج -بيئة Thayer-martin تستخدم لتنمية مكورات السيلان *Neisseria gonorrhoeae* .

2-البيئات الانتقائية selective media : هي الاوساط التي تسمح بأنواع معينة فقط للنمو وذلك بسبب.
أ -غياب الموارد المغذية الضرورية والحرجة التي تجعل الوسط غير مناسب لنمو بعض الاحياء المجهرية وليس جميعها.

ب -وجود مواد مثبطة لنمو انواع من الاحياء المجهرية مثل Crystal violet,antibiotics NaCl ، مثال
1-وسط ماكونكي MacConkey Agar هذا الوسط يحتوي على املاح الصفراء bile salts التي تسمح للبكتريا المعوية السالبة لصبغة كرام بالنمو بينما تثبط البكتريا اللامعوية الموجبة لصبغة كرام .ان وجود املاح الصفراء وcrystal violet هو الذي يجعل هذا الوسط انتقائي لأنه يثبط +G ويسمح -G بالنمو .

2-وسط Mannitol Salt Agar هذا الوسط يحتوي ملح الطعام NaCl 7.5 % الذي يمنع كل انواع البكتريا ما عدا جنس العنقوديات Staphylococccus.
3-الاوساط التفريقية Differential media تحتوي هذ الاوساط على مواد تجعل بعض البكتريا تظهر بشكل يختلف عن الانواع الاخرى وتسمح بالتفريق بين نوع وأخر مثال ذلك وسط ماكونكي هذا الوسط يحتوي سكر اللاكتوز ودليل الاحمر المتعادلneutral red على بعد نمو البكتريا المعوية على هذا الوسط قسم منها يخمر سكر اللاكتوز مثل coli *Escherichia* لتنتج حامض يغير لون الدليل بحيث تبدو المستعمرات بلون وردي غامق مثل بكتريا *proteus mirabilis* تظهر مستعمراتها شاحبة اللون .

قسم من البيئات تكون انتقائية وتفريقية في نفس الوقت مثل وسط ماكونكي ووسط EMB اما وسط MSA فهو ايضا انتقائي وتفريقي في نفس الوقت حيث يحتوي على دليل الفينول الاحمر .الوسط مهم للتفريق بين بكتريا *Staphylococcus aureus* المخمرة للمانيتول عن بقية انواع العنقوديات غير المخمرة له حيث تحول الاولى الوسط من الاحمر إلى الاصفر (.الحامضي) اما الثانية فتنمو دون تغير لون الوسط .
وسط اكار الدم يعتبر من الاوساط الغنية والتفريقية في نفس الوقت حيث انه اضافة إلى كونه وسط غني فانه يميز بين انواع البكتريا الممرضة اعتمادا على قدرتها على تحليل الدم بإفرازها انزيم يسمى Hemolysin فمثلا بكتريا *Streptococcus pneumonia* تحل الدم جزئي Alpha hemolysis حيث تظهر منطقة مخضرة حول المستعمرة بينما بكتريا *Streptococcus pyogenes* تحلل الدم تحلل كامل اذ تظهر منطقة شفافة حول المستعمرة تسمى Beta hemolysis انواع اخرى من البكتريا لا تحلل الدم نهائيا مثل *Staphylococcus epidermidis* يدعى هذا النوع من التحلل gamma hemolysis .
بعض الاوساط قد تكون غنية وانتقائية حسب الحاجة بإضافة البنسلين مثلا إلى الوسط يجعل الوسط انتقائيا للبكتريا السالبة لصبغة كرام.
4-الاوساط الخاصة special media اوساط لإغراض خاصة تستخدم لعزل وتنمية مجموعة معينة وأحيانا التفريق بين نوعين من البكتريا مثال ذلك وسط Lowenstein-jensen media الخاص بتنمية
بكتريا السل والذي يحتوي على صبغة الملكايت الاخضر التي تثبط نمو كل انواع البكتريا ما عدا بكتريا السل .هذا الوسط يستخدم لتنمية بكتريا السل وبنفس الوقت تفرق بين السل البشري والسل البقري .

طرق الحصول على مزارع نقية: Pure Culture

وهي تحتوي على خلايا نوع واحد من الكائنات الحية الدقيقة ، اما المزرعة المختلطة Mixed Culture فهي التي تحتوي على نوعين أو اكثر من الكائنات الحية الدقيقة وعادة لا توجد البكتريا في مزارع بصورة نقية في بيئاتها الطبيعية فلدراسة انشطة وخواص خلايا النوع البكتيري الواحد يتطلب وجودها بصورة نقية وهناك عدة طرق للحصول على المزارع النقية وعادة يتبع للحصول على المزرعة النقية طرق سهلة يتم فيها الزرع على البيئات الصلبة لإتاحة الفرصة لخلايا الانواع البكتيرية المختلطة والموجودة في صور مختلطة ان تنمو على سطح الاكار متباعدة عن بعضها بدرجة تسمح لأن ينتج عن نمو كل خلية مفردة مستعمرة فردية تختلف في مواصفاتها عن الانواع الاخرى فينا يلي اهم الطرق للحصول على مزارع نقية للبكتريا:

1-طريقة النشر Spread Method

المواد المطلوبة:
1- مزرعة بكتيرية سائلة العمر 24 -48 ساعة . -2 كحول اثيلي (ايثانول) 95%
3-ناشر زجاجي على شكل حرف L . 4-اطباق وسط TSA 5-ماصات أو سرنجات معقمة.

طريقة العمل:

1 -ينقل 1-5 سم^3 من المزرعة السائل بواسطة السرنج أو ماصة معقمة إلى وسط طبق بتري.
-2 يغمر الناشر في بيكر حاوي على ايثانول وبحذر يمرر فوق لهب بنزين يبرد على سطح الاكار.
3- ينشر المزروع بواسطة الناشر بشكل متجانس على سطح الوسط.
4- يعاد غمر الناشر في الكحول ثم يلهب ويترك تقلب الاطباق وتوضع في الحاضنة وتفحص المستعمرات.

2-طريقة التخطيط Streak Plate Method

أ - تنقل المزرعة البكتيرية بواسطة اللوب المعقم.
ب -يرفع الطبق(الموجود بشكل مقلوب على المنضدة، أي ان الغطاء إلى الاسفل والطبق إلى الاعلى ثم يتم تخطيط حملة اللوب على المنطقة وبشكل Zigag على مساحة تقريباً ثلث الطبق.
ج -تعقم اللوب وتبرد ثم نقطع المنطقة بخط واحد ويستمر على شكل Zigzag مسافة ثلث طبق اخرى.
د -وأخيرا يعقم اللوب وتقطع المساحة بخط واحد مستمر إلى الثلث الاخير.
ه -تقلب الاطباق وتحضن بدرجة 37 م.

3-طريقة صب الاطباق Pouring Plate Method

وهي احد طرق الحصول على مزارع نقيه واحد طرق تعداد البكتريا .

التحضين الهوائي واللاهوائي Aerobic and Anaerobic Incubation

يتباين مستوى الاوكسجين في البيئات المختلفة في الكرة الارضية على سبيل المثال يحتوي الهواء الجوي على 20 % من غاز الاوكسجين والباقي نتروجين (خامل) وثاني اوكسيد الكاربون، اما في البيئات المائية فتكون قابلية ذوبان الاوكسجين ضعيفة وسرعان ما تستفيد هذه الكميات القليلة من قبل الكائنات الحية المائية لذلك تنشا بيئات خالية نسبيا من الاوكسجين ومع ذلك قد تتواجد بعض الاحياء حسب احتياجها للاوكسجين إلى المجاميع التالية :

a) Obligate aerobic bacteria: وهي البكتريا التي لا تعيش بدون الهواء 20% اوكسجين من امثلتها بكتريا *Pseudomonas fluorescence* هذا النوع من البكتريا يحصل على الطاقة من التنفس الهوائي وتحتوي على انزيمي catalase and superoxide dismutase

b) anaerobic bacteria: وهي البكتريا التي تحصل على الطاقة من التنفس اللاهوائي أو التخمر .لا تتكاثر بوجود الاوكسجين بل تموت في حالة وجود من امثلتها بكتريا *Clostridium botulinum* التي تسبب التسمم الغذائي خاصة في المعلبات غير المعقمة بصورة صحيحة حيث تنبت السبورات في ظروف لا هوائية داخل الاغذية المعلبة إلى خلايا خضرية تنتج سموم خارجية.

c) Facultative aerobic bacterria: تنمو بوجود الاوكسجين وبغيابه أي انها اختيارية تحصل على الطاقة من التنفس الهوائي بوجود O_2 أو من عمليات التخمر بغيابه .
عادة يكون النمو افضل في الظروف الهوائية مما هو في التخمر وذلك لان كمية الطاقة ATP تكون اكثر من أي عملية اخرى مثال ذلك *Escherichia coli* تعيش في الامعاء .نلاحظ انتشار النمو في جميع الانبوبة ، اما النمو الكثيف على سطح الانبوبة يعزى إلى قدرة البكتريا على التنفس.

d) Microaerophilic bacteria: وهي التي تحتاج إلى كميات قليلة من الاوكسجين 0.2-10% للتنفس الهوائي اما التراكيز الاعلى من ذلك تكون مثبطة لها ومن امثلتها بكتريا *Spirillum volutans* التي تعيش في البيئات المائية و *Helicobacter pylori* التي تسبب القرحة وتنتج كميات قليلة من انزيمي catalase and superoxide dismutase

e) Aerotolerant bacteria تستطيع النمو بوجود الاوكسجين ولكن لا تستفاد منه لإغراض الطاقة هي مخمرة اجبارية مثال ذلك بكتريا Lactobacillus التي تستخدم في انتاج الاجبان و *Streptococcus pyogenes* الي تسبب التهاب اللوزتين يطلق عليها احيانا مصطلح مخمرة مجبرة ولذلك النمو غير كثيف على السطح.

طرق الحصول على ظروف لاهوائية:

1- Deep agar : الطبقات السطحية منه تحتوي على كميات من الاوكسجين اكثر من الطبقات السفلى، وتقل هذه الكميات كلما اخترقنا الاكار إلى الاسفل.

2-الوسط المغذي السائل :ممكن ازالة الاوكسجين منه وذلك بتسخين الوسط إلى درجة الغليان لمدة عشر دقائق لطرد الاوكسجين، اضافة إلى استخدام البرافين المعقم بعد التلقيح لغزل الهواء عن الوسط.

3-اضافة مواد مختزلة لمنع تهوية الوسط بتيرات الحمل مثل:

الكلوكوز او أي سكر اخر - حامض الثايوكلايكوليك الذي يحتوي على مجموعة SH– حرة تتحد مع الاوكسجين. - عوامل مختزلة مثل حامض الاسكوربيك ، اللحم المطبوخ،- مسامير .

4- Anaerobic jar: هو عبارة عن وعاء محكم السد، ممكن خلق ظروف لاهوائية بدخله إما بسحب الاوكسجين منه بواسطة vacuums واستبداله بخليط من نيتروجين وثاني اوكسيد الكربون (كلاهما يسرع نمو بعض الاحياء المجهرية) يمر الهيدروجين عند دخوله إلى الوعاء على مصدر بلاتيني(عامل يسرع من تفاعل اللاوكسجين المتبقي داخل الوعاء مع الهيدروجين لتكوين الماء) او ممكن استخدام اكياس gas pack

الجاهزة بعد اضافة 10 مل من الماء إلى محتويات هذا الكيس ليتحرر غاز الهيدروجين وثاني اوكسيد الكربون .يتفاعل الاوكسجين المحصور داخل الوعاء مع الهيدروجين المتحرر من الكيس لتكوين الماء وخلق ظروف لا هوائية.

5- Wright's tube: ممكن ايضا خلق ظروف لا هوائية داخل الوسط الصلب (المائل) باستخدام بلورات pyrogallol التي تتأكسد في الوسط بوجود هيدروكسيد الصوديوم .،

بعد تلقيح البكتريا على سطح المائل، توضع طبقة من القطن، ثم طبقة من بلورات pyogallol وأخيرا يضاف 1 مل من NaOH ثم تغلق بسداد محكم، تقلب وتحضن .

6- Brewer’s anaerobic petri dish: هذا النوع من الاطباق والمبين مصمم بحيث يحتوي الغطاء على جسر يحجز سطح الوسط عند غلق الطبق ويمنع دخول الهواء إلى داخل الطبق ويستخدم وسط اكار خاصة بهذه الطريقة Brewer’s anaerobic agar الذي يحتوي على تركيز عالي من thioglycolate acid الذي يحتوي في الوسط

7-تنمية البكتريا اللاهوائية مع بكتريا هوائية في نفس الطبق (مع ترك مسافة بينهما لمنع الثلوث) وسد الطبق سد محكم في هذه الحالة ستقلل البكتريا الهوائية من oxygen tesion لتسمح للبكتريا اللاهوائية بالنمو .

العمل في المختبر:

1-تحيد متطلبات البكتريا للأوكسجين:

-توضع انابيب لوسط Tryptic soy agar في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة عشر دقائق.

-تبرد الانابيب إلى درجة تقريبا° 45 م باستخدام ماء الحنفية .تلقح الانابيب بالبكتريا.

-باستخدام الابرة المعقمة وذلك بغرزها بعمق داخل الانبوبة .تمزج البكتريا مع الوسط بحذر(بين راحة اليدين) ثم برد الانبوبة وبسرعة باستخدام ماء الحنفية سجل اسم البكتريا ثم حضن بدرجة حرارة 37 ° لمدة 24 ساعة .لاحظ مناطق النمو وحدد نوع البكتريا حسب احتياجاتها للأوكسجين.

2-تنمية البكتريا في ظروف لا هوائية:

- يسخن الوسط المغذي السائل Tryptic soy broth لمدة 5 دقائق لطرد الاوكسجين يبرد ثم يلقح بالبكتريا.

-تحت ظروف معقمة يضاف طبقة من الزيت أو شمع البرافين المعقمين ثم تحضن الانابيب بدرجة حرارة° 37 م لمدة 48 ساعة .افحص النمو(تعكر الوسط السائل) من عدمه .